

# NGHIÊN CỨU KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG XÉT NGHIỆM LDL-CHOLESTEROL BẰNG PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG TRỰC TIẾP

NGUYỄN THỊ CẨM CHÂU, Bệnh viện Đại học Y Dược Tp. HCM  
VŨ QUANG HUY, Đại học Y Dược Tp. HCM

## TÓM TẮT

Mục tiêu: Kiểm tra chất lượng xét nghiệm định lượng LDL-C huyết thanh bằng phương pháp đo lường trực tiếp trên hai hệ thống thiết bị, hóa chất sử dụng. Vật liệu và phương pháp: Hệ thống Máy sinh hóa tự động: Hitachi 917 - hóa chất hãng Invicon Diagnostics; và Olympus AU 2700 - hóa chất hãng Olympus Diagnostics. Định lượng LDL-C trực tiếp phương pháp của Denka Seiken; Kiểm tra chất lượng xét nghiệm định lượng LDL-C trên các mẫu chuẩn (Biorad 14181, Biorad 14182, ODC0005-1, ODC0005-2) và mẫu bệnh phẩm gộp. Kết quả: Độ đúng: D% (bias) = 1,11; 1,47; 1,06; 0,46 (với hóa chất Olympus) và 2,52; 1,36; 3,37; 1,29 (hóa chất Invicon). Độ chính xác trong cùng loạt chạy và giữa các loạt chạy trên mẫu chuẩn CV tương ứng là: 1,85% và 1,6% (hóa chất Olympus); và 1,90 và 2,08 (hóa chất Invicon); Sai số toàn bộ (TE) trên toàn bộ 4 mẫu chuẩn lần lượt là 5,31; 5,58; 7,59; 4,71 với hóa chất Olympus; và: 6,58; 8,49; 10,27; 5,58 với hóa chất Invicon. Tính tuyến tính đều đạt yêu cầu chất lượng. Kết luận: đảm bảo chất lượng để thực hiện đánh giá hiệu quả phục vụ lâm sàng của xét nghiệm LDL-C bằng phương pháp định lượng trực tiếp.

Từ khóa: xét nghiệm LDL-C, định lượng trực tiếp

## SUMMARY

Objective: Quality control Evaluation of the new method that use liquid assay techniques to direct measure the LDL-cholesterol; Instruments: two automated chemistry systems of Hitachi 917 and Olympus AU 2700 using reagents of Invicon Diagnostics and Olympus Diagnostics respectively; Methods: homogeneous assay for serum LDL-cholesterol (LDL-C) by Denka-Seiken method using control samples (Biorad 14181, Biorad 14182, ODC0005-1, ODC0005-2) and pool samples;

Results: Accuracy: D%(bias)= 1.11; 1.47; 1.06; 0.46 (Olympus reagent) and 2.52; 1.36; 3.37; 1.29 (Invicon reagent).; Precision within run and between run on control samples: CV: 1.85% and 1.6% for Olympus; and 1.90 and 2.08 for Invicon reagents: all meet criteria of NCEP (CV  $\leq$  4 %); TE (total error) on four control samples: Olympus: 5.31; 5.58; 7.59; 4.71; and Invicon: 6.58; 8.49; 10.27; 5.58, meet criteria of NCEP TE  $\leq$  12%. Conclusion: the new method meets quality criteria of NCEP for the accurate measurement of LDL-C, can explore for usage of direct measure LDL-C in clinical practice.

Key words: low density lipoprotein – Cholesterol (LDL-C); National Cholesterol Education Program – NCEP; Accuracy; Precision; TE (total error).

## ĐẶT VẤN ĐỀ

Cholesterol tỷ trọng thấp (low density lipoprotein-Cholesterol, viết tắt LDL-C), đóng vai trò then chốt gây nên và ảnh hưởng tới quá trình vữa xơ mạch máu đặc biệt là mạch vành.

Xét nghiệm định lượng LDL-C được Chương trình đào tạo quốc gia về Cholesterol Hoa kỳ (NCEP) khuyến cáo sử dụng để phát hiện tình trạng cần điều trị hạ Cholesterol và theo dõi quá trình điều trị hạ cholesterol máu (1, 2) nhằm ngăn ngừa, giảm thiểu hậu quả bệnh lý mạch vành và các cơn đột quỵ. Vì vậy, sự chính xác của xét nghiệm này - cũng như của xét nghiệm nói chung - là rất quan trọng.

Các phương pháp mới với kỹ thuật sử dụng dung dịch đồng nhất cho phép đo lường trực tiếp LDL-C trên các thiết bị sinh hóa tự động đã được phát triển gần đây với kỳ vọng khắc phục những hạn chế của phương pháp xác định LDL-C bằng phương pháp tính toán của Friedewald .

Vì vậy chúng tôi thực hiện đề tài này tại khoa Xét nghiệm, Bệnh viện Đại học Y Dược Tp Hồ Chí Minh,

215 Hồng Bàng Q.5 nhằm:

Đánh giá Kiểm tra chất lượng của xét nghiệm định lượng LDL-C huyết thanh bằng phương pháp mới đo lường trực tiếp trên hai hệ thống thiết bị, hóa chất đang sử dụng.

Nhằm phát triển ứng dụng kỹ thuật mới trong việc xét nghiệm phục vụ bệnh nhân.

**VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

**1. Vật liệu và thiết bị nghiên cứu:** sử dụng hai hệ thống:

\* Hệ thống1: - Máy sinh hóa tự động Hitachi 917  
- Hóa chất hãng Invicon Diagnostics: LDL-C: code 217100; lot 086405

\* Hệ thống2: - Máy sinh hóa tự động Olympus AU 2700

- Hóa chất hãng Olympus Diagnostics. LDL-C: code OSR 6283

**2. Phương pháp nghiên cứu:**

2.1. Định lượng LDL-C trực tiếp: theo phương pháp của Denka Seiken (3).

2.2. Kiểm tra chất lượng xét nghiệm định lượng LDL-C trực tiếp:

**a. Độ đúng (Accuracy)**

Sử dụng mẫu chuẩn control I (mức nồng độ thấp) và II (mức nồng độ cao) của Olympus ODC0005 (ODC005-1 và ODC0005-2), và Biorad (Lyphochek assayed chemistry control) Lot 14181 và 14182 (Biorad 81 và Biorad 82).

Mỗi mẫu control chạy định lượng LDL-C 20 lần. Xác định D% (bias)

Theo quy định của NCEP cần đạt  $D\% \leq 4\%$

**b. Độ chính xác hay độ lặp lại (Precision):** sử dụng 2 loại mẫu:

**Mẫu chuẩn** Dùng control I, II-Olympus Code ODC0005, và Biorad Lot 14181 và 14182.

Chia nhỏ thành 20 mẫu, bảo quản ở 0°C.

**Mẫu bệnh phẩm gộp (mẫu pool):**

Chuẩn bị mẫu gộp: các mẫu huyết tương bệnh nhân trộn lẫn đồng nhất tạo thành mẫu ở các vùng nồng độ: thấp: < 100 mg/dl; trung bình: 100 – 130 mg/dl, và cao > 160 mg/dl.

Chia mỗi nồng độ thành nhiều mẫu, bảo quản ở 0°C.

**Độ chính xác trong cùng loạt chạy (within run):**

Mẫu chuẩn hay mẫu bệnh phẩm gộp: định lượng LDL-C (n=20 lần). Xác định CV.

**Độ chính xác giữa các loạt chạy khác nhau (between run):**

Mẫu chuẩn hay mẫu bệnh phẩm gộp: Mỗi ngày định lượng LDL-C với n=3 lần để lấy trung bình. Thực hiện 20 ngày liên tiếp. Xác định CV%

Theo qui định của NCEP độ chính xác cần đạt được là  $CV \leq 4\%$

**c. Sai số toàn bộ (Total error – TE):**Sai số toàn bộ được tính theo công thức:

$$SSTB = D\% + 1,96 * CV\%$$

Với D% và CV% là độ đúng và độ chính xác của

chất chuẩn

Theo qui định của NCEP  $SSTB \leq 12\%$

**d. Tính tuyến tính:**

Dùng control II của Olympus làm mẫu chuẩn. Pha loãng bằng nước cất thành các độ pha loãng 75%, 50%, 25%, 10%, 5%. Định lượng LDL-C mỗi nồng độ 3 lần, tính giá trị trung bình. Xác định phương trình hồi qui,  $R^2$ , r, giá trị B và  $B_0$ .

**2.3. Phương pháp phân tích số liệu:**

Phân tích xử lý số liệu bằng phần mềm thống kê SPSS phiên bản 16.0, và excel 2007.

Loại giá trị bất thường bằng trắc nghiệm Dixon.

Dùng tiện ích frequencies để xác định các giá trị trung bình, độ lệch chuẩn, giá trị lớn nhất, nhỏ nhất

....

Trắc nghiệm t test (Independent-Samples) để so sánh hai số trung bình với  $n > 30$ .

Trắc nghiệm t test để đánh giá ý nghĩa của hệ số hồi quy.

Trắc nghiệm F test để đánh giá tính tương thích của phương trình hồi quy.

Tất cả các giá trị p đều 2 đuôi:  $p < 0,05$  khác biệt có ý nghĩa thống kê.

**KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU**

KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG XÉT NGHIỆM ĐỊNH LƯỢNG LDL-C TRỰC TIẾP

**1. Độ đúng:**

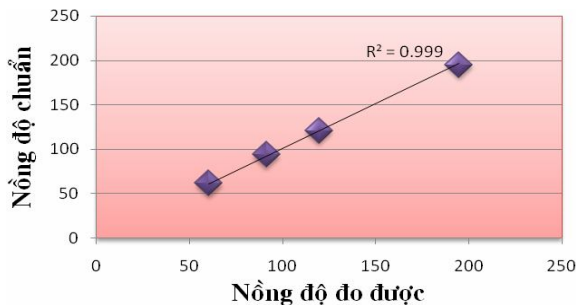
**1.1. Hóa chất Olympus**

Bảng 1. Độ đúng sử dụng hóa chất Olympus

Thông số		Biorad 81	Biorad 82	ODC0005-1	ODC0005-2
Nồng độ LDL-C mẫu chuẩn (mg/dl)	Giá trị đích	121	61,3	94	195
	Giới hạn cho phép	96,6 – 145	49,0 – 73,5	75 – 112	156 – 234
Nồng độ LDL-C đo được (mg/dl)		119,65	60,4	94,1	194,9
Độ đúng (D%)		1,11	1,47	1,06	0,46
Trung bình		0,997			

Phép kiểm Dixon: không có giá trị bất thường đối với trị số thấp nhất và cao nhất đối với mỗi dãy thử nghiệm  $Q < Q_\alpha$  ( $\alpha=0,05$ ).

Độ đúng đạt yêu cầu NCEP, và tuyến tính  $R^2 = 0,9999$  với B(slope) =0,996 (0,965–1,027) ( $p=0,000$ ) và  $B_0$ (intercept) =1,093 ( -2,878 – 5,063) ( $p = 0,358$ ).



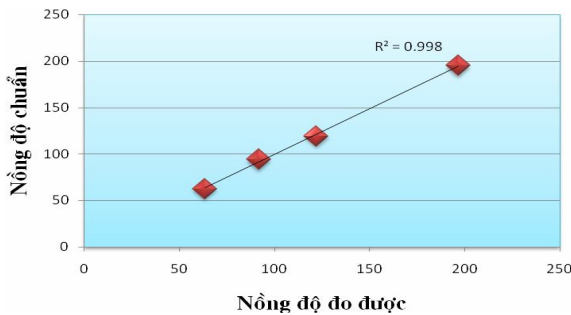
Hình 1: Tuyến tính độ đúng của hóa chất Olympus 1.2. Hóa chất Invicon

Bảng 2. Độ đúng của hóa chất Invicon

Thông số	Biorad 81	Biorad 82	ODC0005-1	ODC0005-2
Nồng độ LDL-C mẫu chuẩn (mg/dl)	Giá trị đích 119	62.5	94	195
	Giới hạn cho phép (95,2 – 143)	(50 – 75)	(75 – 112)	(156 – 234)
Nồng độ LDL-C đo được (mg/dl)	122	63,35	91,8	196,5
Độ đúng (D%)	2,52	1,36	3,37	1,29
Trung bình	2,134			

Phép kiểm Dixon: không có giá trị bất thường đối với trị số thấp nhất và cao nhất đối với mỗi dãy thử nghiệm  $Q < Q_{\alpha}$  ( $\alpha=0,05$ ).

Độ đúng đạt yêu cầu NCEP với  $D=2,134\%$  và tuyến tính  $R^2=0,9987$  với  $B(\text{slope})=0,986$  (0,878–1,094) ( $p=0,0006$ ) và  $B_0$  (intercept) (-12,941–14,723) ( $p=0,808$ ).



Hình 2: Tuyến tính độ đúng của hóa chất Invicon

## 2. Độ chính xác

### 2.1. Độ chính xác trên mẫu chuẩn Hóa chất Olympus

Bảng 3. Độ chính xác trong cùng loạt chạy của hóa chất Olympus trên mẫu chuẩn

Thông số	Biorad 81	Biorad 82	ODC0005-1	ODC0005-2
n = số lần chạy	20	20	20	20
$\bar{x}$ (mg/dl)	119,65	60,4	93,95	194,9
SD	1,39	0,88	3,28	3,57
CV %	1,16	1,46	2,96	1,83
$\overline{CV}$ %	1,85			

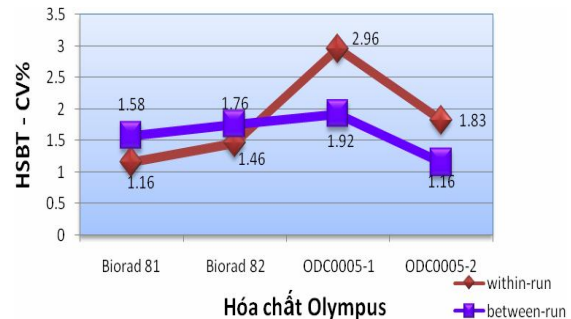
Độ chính xác trong cùng loạt chạy dùng hóa chất Olympus trên các mẫu chuẩn đều  $< 4\%$ .

Bảng 4: Độ chính xác giữa các loạt chạy khác nhau hóa chất Olympus trên mẫu chuẩn

Thông số	Biorad 81	Biorad 82	ODC0005-1	ODC0005-2
n = số lần chạy	20	20	20	20
$\bar{x}$ (mg/dl)	119,92	60,15	95,05	195,68
SD	1,90	1,06	1,83	2,27
CV %	1,58	1,76	1,92	1,16
$\overline{CV}$ %	1,6			

Độ chính xác giữa các loạt chạy của hóa chất Olympus trên các mẫu chuẩn đều  $< 4\%$ .

Số sánh độ chính xác trong cùng loạt chạy và giữa các loạt chạy của hóa chất Olympus khác biệt không có ý nghĩa thống kê (với  $p = 0,52$ ,  $\alpha = 0,05$ )



Hình 3: Độ chính xác của hóa chất Olympus Hóa chất Invicon

Bảng 5: Độ chính xác trong cùng loạt chạy của hóa chất Invicon trên chất chuẩn

Thông số	Biorad 81	Biorad 82	ODC0005-1	ODC0005-2
n số lần chạy	20	20	20	20
$\bar{x}$ (mg/dl)	122	63,35	91,8	196,5
SD	1,08	1,22	2,57	3,88
CV %	0,88	1,93	2,8	1,98
$\overline{CV}$ %	1,90			

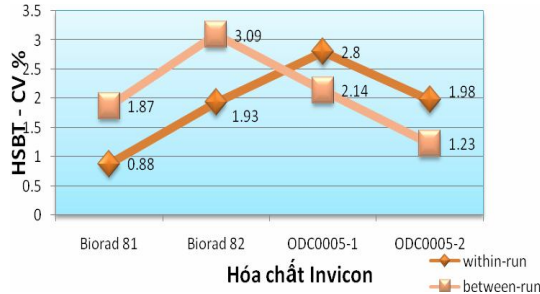
Độ chính xác trong cùng loạt chạy của hóa chất Invicon với các mẫu chuẩn đều đạt yêu cầu của NCEP là  $\leq 4\%$ .

Bảng 6: Độ chính xác giữa các loạt chạy khác nhau hóa chất Invicon trên mẫu chuẩn

Thông số	Biorad 81	Biorad 82	ODC0005-1	ODC0005-2
n = số lần chạy	20	20	20	20
$\bar{x}$ (mg/dl)	118,76	61,44	94,08	197,82
SD	2,22	2,05	2,01	2,46
CV %	1,87	3,09	2,14	1,23
$\overline{CV}$ %	2,08			

Độ chính xác giữa các loạt chạy trung bình của hóa chất Invicon với mẫu chuẩn đều đạt yêu cầu của NCEP.

Độ chính xác trong cùng loạt chạy và giữa các loạt chạy của hóa chất Invicon trên chất chuẩn khác nhau không có ý nghĩa với  $p$  là 0,69,  $\alpha = 0,05$ .



Hình 4: Độ chính xác của hóa chất Invicon

## 2.2 Độ chính xác trên mẫu bệnh phẩm gộp (mẫu pool):

### Hóa chất Olympus

Bảng 7. Độ chính xác của bộ kit Olympus trên bệnh phẩm

Thông số	Cùng loạt chạy			Giữa các loạt chạy		
	< 100	100 - 130	> 160	< 100	100 - 130	> 160
Nồng độ (mg/dl)						
$\bar{x}$ (mg/dl)	93,45	124,37	162,13	93,41	123,77	163,14
SD	2,06	2,03	2,17	2,01	1,88	2,24
CV%	2,21	1,63	1,34	2,15	1,52	1,38
p	0,913					

Trắc nghiệm t-test so sánh độ chính xác của bộ kit trên bệnh phẩm với những mức nồng độ khác nhau cho thấy:

Độ chính xác của hóa chất Olympus với mẫu gộp, đạt yêu cầu NCEP (bảng 7).

Sự khác biệt về độ chính xác trong cùng loạt chạy hay giữa các loạt chạy của hai loại hóa chất không có ý nghĩa thống kê (với  $p$  là 0,913,  $\alpha = 0,05$ ).

### Hóa chất Invicon

Bảng 8: Độ chính xác của hóa chất Invicon trên mẫu gộp

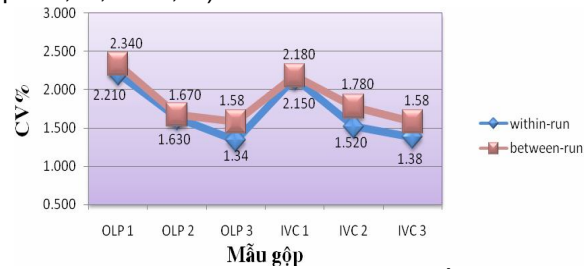
Nồng độ (mg/dl)	Cùng loạt chạy			Giữa các loạt chạy		
	< 100	100 - 130	> 160	< 100	100 - 130	> 160
$\bar{x}$	93,81	124,24	162,47	93,738	123,563	162,595
SD	2,19	2,07	2,57	2,54	2,21	2,54
CV%	2,34	1,67	1,58	2,18	1,78	1,56
p	0,942					

Trắc nghiệm t - test so sánh độ chính xác của bộ kit trên bệnh phẩm với những mức nồng độ khác nhau cho thấy:

Độ chính xác của hóa chất Invicon với mẫu gộp, đạt yêu cầu NCEP (bảng 8).

Độ chính xác trong cùng loạt chạy hay giữa các loạt chạy của hai loại hóa chất khác nhau không có ý nghĩa (với  $p$  là 0,942,  $\alpha = 0,05$ ).

So sánh về độ chính xác ở ba mức nồng độ khác nhau của cả hai loại hóa chất Olympus và Invicon cho thấy khác nhau không đáng kể về thống kê ( với  $p$  là 0,86,  $\alpha = 0,05$ ).



Hình 5: Độ chính xác của hóa chất Olympus và Invicon trên mẫu gộp

## 3 Sai số toàn bộ:

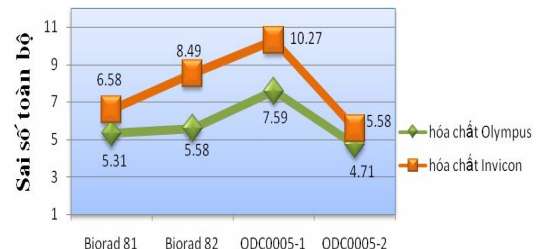
Bảng 9 : Sai số toàn bộ của bộ kit Olympus

Mẫu chuẩn	Độ đúng D% (bias)	Độ chính xác CV%	Sai số toàn bộ (total error)
Biorad 81	1,47	1,96	5,31
Biorad 82	1,11	2,28	5,58
ODC0005-1	1,06	3,33	7,59
ODC0005-2	0,46	2,17	4,71

Bảng 10 : Sai số toàn bộ của bộ kit Invicon

Control	Độ đúng D% (bias)	Độ chính xác CV%	Sai số toàn bộ (total error)
Biorad 81	2,52	2,07	6,58
Biorad 82	1,36	3,64	8,49
ODC0005-1	3,37	3,52	10,27
ODC0005-2	1,29	2,33	5,58

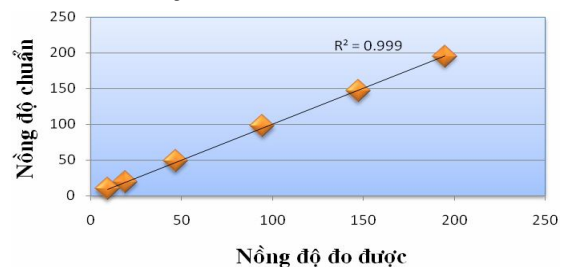
Sai số toàn bộ ở hai loại hóa chất đều đạt tiêu chuẩn NCEP qui định là < 12 %.



### Mẫu chuẩn

Hình 6: Sai số toàn bộ của hóa chất Olympus và Invicon

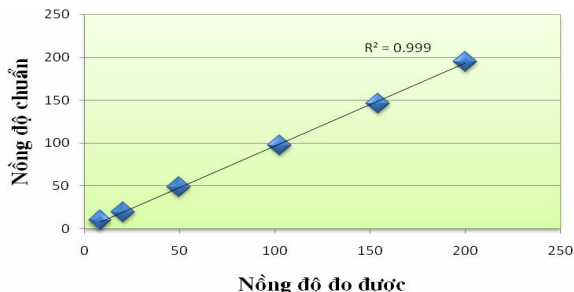
## 1.4 Tính tuyến tính



Hình 7: Đường biểu diễn tuyến tính của hóa chất Olympus

Phương trình hồi qui tuyến tính là một đường thẳng với  $R^2$  tương ứng là 0,9997.

Phương trình đường thẳng  $y = 0,995x + 1,478$  với hệ số B (slope) = (0,97 – 1,012) ( $p=0,000$ ) và hệ số  $B_0$  (intercept) = (-1,203 – 4,159) ( $p = 0,2$ ). Do vậy  $B_0$  không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ), vì vậy phương trình hồi qui tuyến tính là  $y = 1,005x$ .



Hình 8: Đường biểu diễn tuyến tính của hóa chất Invicon

Phương trình hồi qui tuyến tính là một đường thẳng với  $R^2$  tương ứng là 0,9994.

Phương trình đường thẳng  $y=0,959x+ 0,646$  với hệ số B (slope) =(0,927 – 0,991) ( $p=0,000$ ) và hệ số  $B_0$  (intercept) = (-2,953 – 4,245) ( $p=0,6442$ ). Do vậy  $B_0$  không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ), vì vậy phương trình hồi qui tuyến tính là  $y = 0,963x$ .

#### BÀN LUẬN VÀ KẾT LUẬN

- Độ đúng trên toàn bộ 4 mẫu chuẩn là:  $D(\%) = 1,11; 1,47; 1,06; 0,46$  với độ tuyến tính  $R^2 = 0,9999$  (hóa chất Olympus) và  $2,52; 1,36; 3,37; 1,29$  với  $R^2 = 0,9987$  (hóa chất Invicon), đều đạt yêu cầu NCEP ( $D\% \leq 4$ ).

- Độ chính xác:

+ trên mẫu chuẩn : với 4 mẫu chuẩn, trong cùng loạt chạy (within run)  $CV = 1,16; 1,46; 2,96; 1,83$  (hóa chất Olympus) và  $0,88; 1,93; 2,8; 1,98$  (hóa chất Invicon) và giữa các loạt chạy khác nhau (between run):  $1,58; 1,76; 1,92; 1,16$  (hóa chất Olympus) và  $1,87; 3,09; 2,14; 1,23$  (hóa chất Invicon). Tất cả đều đạt yêu cầu của NCEP ( $CV\% \leq 4$ )

+ trên mẫu bệnh phẩm gộp: với 3 nồng độ khác

n nhau theo thứ tự nồng độ tăng dần, trong cùng loạt chạy (within run):  $2,21; 1,63; 1,34$  (hóa chất Olympus) và  $2,34; 1,67; 1,58$  (hóa chất Invicon) và giữa các loạt chạy khác nhau (between run):  $2,15; 1,52; 1,38$  (hóa chất Olympus) và  $2,18; 1,78; 1,56$  (hóa chất Invicon). Tất cả đều đạt yêu cầu của NCEP ( $CV \leq 4\%$ ).

Không có sự khác biệt về thống kê trong cùng loạt chạy (within run) và giữa các loạt chạy khác nhau (between run) trên cả 2 loại mẫu (mẫu chuẩn và mẫu gộp) với cả 2 loại hóa chất .

- Sai số toàn bộ (TE: total error) trên các mẫu chuẩn: với hóa chất Olympus là :  $5,31; 5,58; 7,59; 4,71$ ; và Invicon là:  $6,58; 8,49; 10,27; 5,58$

- Độ tuyến tính:

Hệ số tương quan (HSTQ) giữa nồng độ chuẩn và nồng độ đo được là  $r = 0,9998$  (hóa chất Olympus) và  $r = 0,9997$  (hóa chất Invicon), như vậy có mối tương quan thuận rất chặt chẽ giữa nồng độ thực và nồng độ đo được ( $p < 0,000$ ,  $\alpha = 0,05$ ) ở cả 2 loại hóa chất.

Kiểm tra chất lượng xét nghiệm LDL-C cho thấy cả hai hệ thống thiết bị và hóa chất nghiên cứu đều đạt được những quy định của NCEP về độ đúng (bias %), độ chính xác (CV%), và sai số toàn bộ (TE), đảm bảo chất lượng để đánh giá hiệu quả phục vụ lâm sàng của xét nghiệm LDL-C bằng phương pháp định lượng trực tiếp.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. 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 Adult (Adult Treatment Panel III). JAMA 2001; 285: 2486-97.
2. American Academy of Pediatrics. National Cholesterol Education Panel on Blood Levels in Children and Adolescents. Pediatrics 1992; 89: 525-84.
3. Sakaue T, Hirano T, Yoshino G, Sakai K, Takeuchi H, Adachi M. Reactions of direct LDL-cholesterol assays with pure LDL fraction and IDL: comparison of three homogeneous methods. Clin Chim Acta 2000;295:97-106.