

• 论 著 •

改良酶法肌酐测定试剂的研制

黄青平¹, 沃燕波², 张桂春², 蔡晓忠²

(1. 青海省海南藏族自治州人民医院, 青海 813000; 2. 宁波美康生物科技股份有限公司, 浙江宁波 315100)

摘 要:目的 探讨建立一种改良酶法肌酐(Cr)测定试剂,并考察其与进口 Cr 测定试剂(日本东洋纺公司酶法 Cr 试剂)对血清测定的可比性及偏倚。方法 采用酶法测定 Cr 反应前后吸光度的变化,探讨试剂各成分和浓度对检测性能的影响,并在同一台全自动生化分析仪上同时测定两种试剂的空白吸光度(A 值)、分析灵敏度,对自主研发试剂的精密性、线性范围及方法学指标进行评价。结果 自主研发试剂的空白 A 值为 0.009,分析灵敏度的 A 值变化率为 0.13,优于进口试剂。自主研发试剂高、低值血清测定变异系数分别为 1.5%和 1.1%;线性范围为 0~2 850 μmol/L;方法学比对回归方程为 $Y=0.98X+1.15$, $r=0.999$;估计偏倚低于允许误差。以相对偏差不小于 10%作为有明显干扰的评判指标,结果显示 35 mmol/L 肌酸、3.42 mmol/L 胆红素、0.03 g/L 维生素 C、5 g/L 血红蛋白、1 450 浊度乳糜对高、低值浓度标本检测结果均无干扰。结论 自主研发的 Cr 测定试剂性能良好,与进口试剂之间具有良好的相关性,符合临床应用基本要求。

关键词:肌酐; 酶法; 方法学比对

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.04.030

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)04-0503-03

Development of improved enzymatic creatinine reagents

Huang Qingping¹, WO Yanbo², Zhang Guichun², Cai Xiaozhong²

(People's Hospital of Tibetan Autonomous Prefecture, Qinghai 813000, China; Ningbo Medicalsystem Biotechnology Co., Ltd, Zhejiang 315100, China)

Abstract:Objective To develop improved enzymatic creatinine(Cr) assay reagents (self-R&D), and to investigate their application on serum detection by comparing with imported commercial Cr reagents(enzymatic Cr reagents from Toyobo).Methods Enzymatic method was used to evaluate the effect of every component and different concentrations of reagents on Cr assay by detecting the alteration of absorbance of Cr before or after the reaction. Meanwhile, the blank absorbance and analysis sensitivity of self-R&D and imported reagents, the technical indicators of precision, linearity, as well as method comparison of self-R&D reagents, were detected on the same automatic biochemical analyzer. Results The blank absorbance of self-R&D reagents was 0.009, and the detection sensitivity was 0.13, better than that of imported Cr reagents. The coefficient of variation (CV) of high and low values of serum of self-R&D reagents were 1.5%, and 1.1%, respectively. The linear range was 0—2 850 μmol/L and the method comparison result was $Y=0.98X+1.15$ ($r=0.999$). The expected bias was less than the allowable error region. Using relative deviation $\geq 10\%$ as an index to evaluate the existence of significant interference, it shows that 35 mmol/L of creatine, 3.42 mmol/L of bilirubin, 0.03 g/L of vitamin C, 5 g/L of hemoglobin and 1450 FTU chyle in both low and high concentration serum samples did not interfere with the test result. Conclusion The quality of self-R&D reagents was good, and there was a good relativity between self-R&D reagents and imported Cr reagents with excellent quality. This indicates the self-R&D reagents could satisfy the application requirements of the clinics.

Key words: creatinine; enzymatic method; method comparison

血清肌酐(Cr)浓度及其与尿酸浓度计算所得的 Cr 清除率是既简单又可可靠的肾小球滤过功能指标,深受临床重视^[1]。目前 Cr 的测定常用碱性苦味酸法(Jaffe 法)或酶法。Jaffe 法虽然试剂便宜,但线性范围窄,易受血清中其他假性 Cr 物质的干扰。酶法测定技术是利用 Cr 在肌酐酶、肌酸酶、肌氨酸氧化酶、过氧化物酶等酶及显色剂和水、氧的共同作用下生成酞亚胺(红色),通过检测反应终点的吸光度来推算样品中 Cr 浓度,明显减少了反应的干扰,提高了特异性,但酶法测定过程中 Cr 水解后产生的肌酸和内源性肌酸同时转化为酞亚胺, Cr 测定结果包括了 Cr 和肌酸之和^[2]。为解决内源性肌酸干扰,本研究对现有酶法 Cr 检测试剂进行了改良,并观察了其进口 Cr 测定试剂对血清检测的可比性及偏倚评估。

1 材料与与方法

1.1 仪器与试剂

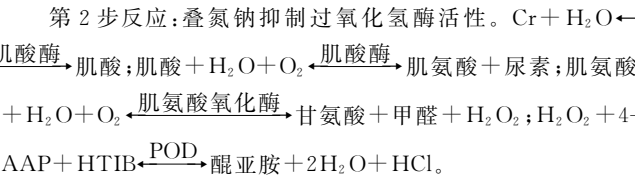
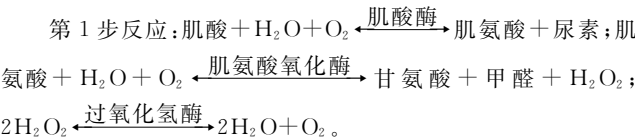
1.1.1 自主研发试剂 试剂 1(R1):100 mmol/L 3-三羟甲基甲胺-2-羟基丙磺酸(TAPSO)缓冲液(pH 值 8.1),肌酸酶 30 kU/L,肌氨酸氧化酶 15 kU/L,维生素 C 氧化酶 2 kU/L,过氧化氢酶 350 kU/L,3-羟基-2,4,6-三碘苯甲酸(HTIB)6 mmol/L,乙二胺四乙酸二钠(EDTA- Na_2)1 mmol/L;(2)试剂 2(R2):100 mmol/L TAPSO(pH 值 8.0),肌苷酶 400 kU/L,过氧化物酶(POD)50 kU/L,亚铁氰化钾 0.1 mmol/L,4-氨基安替比林(4-AAP)2 mmol/L,蔗糖 60 g/L,叠氮钠 0.8 g/L。

1.1.2 进口试剂 酶法 Cr 测定试剂,购自日本东洋纺公司(批号 120515)。

1.1.3 仪器 日立 7180 全自动生化分析仪。

1.2 测定原理 采用酶法测定。先利用 R1 中的过氧化物酶消除内源性肌酸产生的过氧化氢,再由 R2 中的抑制剂叠氮钠抑制 R1 中的过氧化物酶,进而采用酶法测定样本中 Cr 浓度。

具体反应过程如下。



1.3 方法 反应温度为 37℃,比色杯光径为 1.0 cm,检测主波长 546 nm,副波长 700 nm,样品(校准管以校准品做样品)加 R1 混匀,孵育 5 min 后加入 R2 混匀,记录吸光度(A₁)值,反应 5 min 后,记录 A₂ 值,计算ΔA=A₂-A₁。样品用量 8 μL, R1 用量 200 μL, R2 用量 100 μL。

1.4 性能评价测定方案 有关试剂空白吸光度、分析灵敏度、精密性、线性范围和方法学比对试验等指标评价参照美国临床实验室标准化委员会(NCCLS)相关 EP 系列文件及国内外惯用方法进行^[3-5]。

1.4.1 空白吸光度 在波长 546 nm(光径 1.0 cm)处检测,以蒸馏水为样本,重复测定 2 次。

1.4.2 分析灵敏度 采用自制试剂测定 Cr 浓度为 347 μmol/L 的样品,记录在试剂规定参数下产生的吸光度改变,换算为吸光度变化率。

1.4.3 精密性 按 NCCLS EP5-A2 文件评价^[3]。在室内质控在控的条件下,每天做 2 批实验,每批之间至少间隔 2 h,每批实验同一浓度的实验材料做双份测定,记录实验结果,连续测定 20 d。

1.4.4 线性评价 按 NCCLS EP6-A 文件评价^[4]。取 Cr 高、低值血清标本各 1 份。将高值和低值血清分别按不同比例混合稀释成不同浓度梯度的标本,并将这些标本随机排列进行测定,与预期值做线性对比。

1.4.5 方法学比对试验 按 NCCLS CLSI EP9-A2 文件评价^[5-6]。每天收集检测范围均匀分布的 8 份患者新鲜血清,连续 5 d,共 40 份样本。每份样本都用 2 种试剂各自进行双份测定,测定顺序依 1→8 测定第 1 次,再按反序 8→1 测定第 2 次,以减少交叉污染及漂移对重复测定标本平均值的影响,顺序中的浓度应尽可能随机排列。同一样品均在 2 h 内完成 2 种试剂的测定。

1.4.6 干扰实验 按 NCCLS EP7-A2 文件评价^[7]。分别测定加入肌酸、胆红素、维生素 C、血红蛋白及乳糜干扰物的高、低值混合血清。

1.5 统计学处理 实验数据采用 Excel2003 软件进行统计学分析。

2 结 果

2.1 缓冲液种类及 pH 值选择 经试验测定选用 100 mmol/L TAPSO 缓冲液(pH 值 8.1)作为 R1 的缓冲液,100 mmol/L TAPSO 缓冲液(pH 值 8.0)作为 R2 的缓冲液。

2.2 色原种类及浓度选择 经试验测定选用 6 mmol/L HTIB 作为反应色原。

2.3 过氧化氢酶浓度选择 经试验测定 350 kU/L 的过氧化氢酶为最佳浓度。

2.4 叠氮钠浓度选择 经试验测定 0.8 g/L 叠氮钠能有效抑制过氧化氢酶反应活性。

2.5 试剂性能评价

2.5.1 试剂空白 A 值 自主研发试剂空白 A 值为 0.009,进口试剂空白 A 值为 0.080。

2.5.2 分析灵敏度 采用自主研发试剂测定 Cr 浓度为 347 μmol/L 的样本,其 A 值变化率为 0.13,高于东洋纺试剂的 0.08。

2.5.3 精密性 自主研发试剂测定高、低值血清的批内标准差分别为 0.47 和 1.76,批间标准差分别为 1.16 和 2.60,日间标准差分别为 0.15 和 2.61,总变异系数分别为 1.5% 和 1.1%,达到美国临床实验室改进修正法规(CLIA'88)能力比对检验的分析质量要求(15%)。见表 1。

表 1 精密性性能评价结果

浓度	平均值 (mol/L)	S _{批内}	S _{批间}	S _{日间}	S _总	CV _总
低	85.1	0.47	1.16	0.15	1.26	1.5%
高	373.4	1.76	2.60	2.61	4.08	1.1%

2.5.4 线性范围测定 回归方程为 Y=0.977 2X+22.988, r²=0.999 3;浓度范围为 0~2 850 μmol/L。见图 1。

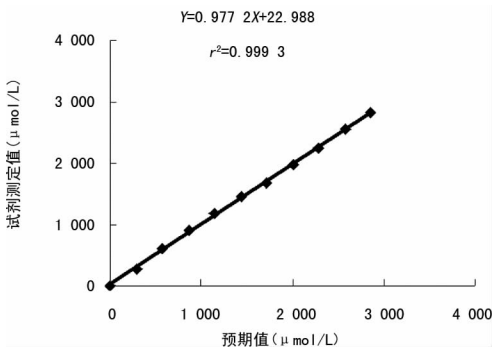


图 1 自主研发试剂的线性范围结果

2.5.5 两种试剂的比对和偏倚评估 (1)检查离群点:通过计算实验评估系统(自主研发试剂)及参比系统(东洋纺试剂)每份标本 2 次测定结果间的差值的绝对值来检查参比系统的允许范围和实验方法的范围,发现无方法内的离群点;通过计算两种方法间测定结果的绝对差值及绝对值可知两方法间测定结果无离群点;(2)散点图、偏倚图分析:以东洋纺试剂检测系统的测定结果为 X,自主研发试剂的检测结果为 Y,经组内、组间离群值检验后,作散点图和偏倚图;从散点图中可以较为直观地看出自主研发试剂与东洋纺试剂方法间的线性关系良好,见图 2;目测可见自主研发试剂与东洋纺试剂测定值呈直线关系,说明方法间相关性较好;偏倚图分别检查的是两种方法重复测定结果均值间的差异和两种方法测定值间的差异,反映 2 种方法间是否存在系统误差,从图中结果来看,自主研发试剂与东洋纺试剂测定同一份血清时差值较小,分布较为合理;(3)X 值合适范围的检验及线性回归分析:回归方程为 Y=0.98X+1.15, r=0.999(>0.975),截距 a 为 1.15,斜率 b 为 0.98,说明测定范围足够宽,误差的影响可以忽略不计;(4)偏差估计:根据 CLSI EP9-A2 文件提供的公式选择 Cr 的 3 个医学决定水平(40、141 和 530 μmol/L)^[6],对预期偏倚及可信区间进行计算,判断两种检测方法是否相当;以 CLIA'88 的允许误差 15% 为限,按“1/2 允许误差”的标准计算获得其允许偏倚分别为 3、10.6 和 40.0 μmol/L^[5];3 个医学决定水平的预期偏差

95%可信区间上限均低于各自的允许偏倚,见表 2,说明自主研发试剂与东洋纺试剂的偏倚可接受,两种试剂间的检测结果具有良好的可比性。

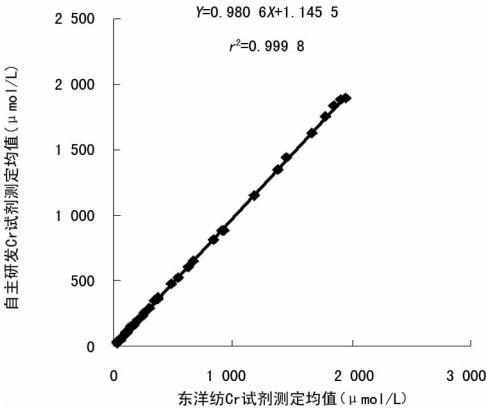


图 2 Cr 重复测定均值的散点图

表 2 预期偏倚及可信区间的比较

医学决定水平 (μmol/L)	预期偏差 95% 可信区间(μmol/L)		允许偏倚 (μmol/L)	偏倚评估
	下限	上限		
40	-2.0	2.7	3.0	可接受
141	-3.7	0.6	10.6	可接受
530	-10.9	-7.3	40.0	可接受

2.5.6 干扰实验 以相对偏差不小于 10%作为有明显干扰的评判指标,结果显示 35 mmol/L 肌酸、3.42 mmol/L 胆红素、0.03 g/L 维生素 C、5 g/L 血红蛋白、1 450 浊度乳糜对高、低值浓度标本检测结果均无干扰。

3 讨 论

酶法 Cr 测定试剂不管是一步酶法或两步酶法,测定过程中 Cr 水解后产生的肌酸和内源性肌酸同时转化为酞亚胺,其测定结果包括了 Cr 和肌酸之和。正常男性血肌酸参考区间为 15~45 μmol/L,女性为 30~80 μmol/L。当发生急性肌损伤、饥饿、糖尿病、营养不良、甲亢、发热时肌酸显著升高,对 Cr 检测结果造成的偏差更显著。为解决内源性肌酸干扰,有学者采用仅以肌酐酶为第二试剂的两步酶测定方法,由于第 1 步反应体系中有 4-AAP 和色原,肌酸酶、肌氨酸氧化酶、POD 催化作用产生酞亚胺,肌酸被转化而被耗尽,当加入肌酐酶后启动 Cr 水解反应生成肌酸,再经肌酸酶、肌氨酸氧化酶、POD 催化作

用产生酞亚胺,内源性肌酸和 Cr 水解产生的肌酸先后呈色,仪器以第 1 步反应产生的酞亚胺为空白,仅以第 2 步产生的酞亚胺计算出肌酸的浓度,以此去除内源性肌酸的影响[8]。由于正常情况下内源性肌酸产生的吸收信号较低且不稳定,从而影响测定结果。

本研究采用过氧化氢酶消除肌酸产生的过氧化氢,产生的水和氧气不会造成本底升高,试剂中的过氧化氢酶在检测反应时被抑制剂叠氮钠完全抑制,不会对反应造成影响,因此可规避以 POD 氧化过氧化氢造成的本底升高的问题。此外,本研究采用了新型色原 HTIB,提高了酶法检测试剂的分析灵敏度,性能评价结果表明自主研发试剂空白吸光度为 0.009,分析灵敏度为 0.13,均优于东洋纺试剂。本研究进一步参照相关 EP 文件对自主研发试剂的相关性能的研究显示,高、低值血清测定变异系数分别为 1.5%和 1.1%,线性范围为 0~2 850 μmol/L,与东洋纺试剂的相关性较高,检测结果具有良好的可比性,说明自主研发试剂(改良酶法)操作简便、灵敏,与进口试剂间具有良好的相关性,符合临床应用基本要求。

参考文献

[1] 王敏,王琦,顾洁,等. 实验室肾功能相关检测项目在诊断慢性肾病中的特性分析[J]. 检验医学,2012,27(5):340-344.
[2] 周碧燕,李友邕,覃政,等. 血清肌酐常规测定方法和临床应用的研究进展[J]. 化学试剂,2011,33(8):718-722.
[3] National Committee for Clinical Laboratory Standards. EP5-A2 Evaluation of precision performance of clinical chemistry devices [S]. Wayne,PA,USA;NCCLS,1999.
[4] National Committee for Clinical Laboratory Standards. EP6-A Evaluation of the linearity of quantitative analytical methods:A statistical approach[S]. Wayne,PA,USA;NCCLS,2003.
[5] National Committee for Clinical Laboratory Standards. EP9-A2 Method comparison and bias estimation using patient samples [S]. Wayne,PA,USA;NCCLS,2002.
[6] 郑松柏,张秀明. 正确度性能评价[A]. //杨有业. 临床检验方法学评价[M]. 北京:人民卫生出版社,2008,118-139.
[7] National Committee for Clinical Laboratory Standards. EP7-A2 Interference testing in clinical chemistry[S]. Wayne,PA,USA; NCCLS,2002.
[8] 梁芳,冯志军,李立和,等. 血清肌酐二步酶法检测新技术研究[J]. 检验医学,2012,27(10):809-812.

(收稿日期:2014-11-10)

(上接第 502 页)

prenatal diagnosis through fluorescence in situ hybridization for preventing aneuploidy related birth defects[J]. Indian J Hum Genet,2013,19(1):32-42.
[2] Stumm M,Wegner RD,Bloechle M,et al. Interphase M-FISH applications using commercial probes in prenatal and PGD diagnostics[J]. Cytogenet Genome Res,2006,114(3/4):296-301.
[3] Evers-Kiebooms G,Swerts A,van den Berghe H. Psychological aspects of amniocentesis; anxiety feelings in three different risk groups[J]. Clin Genet,1988,33(3):196-206.
[4] Tepperberg J,Pettenati MJ,Rao PN,et al. Prenatal diagnosis using interphase fluorescence in situ hybridization (FISH):2-year multi-center retrospective study and review of the literature[J].

Prenat Diagn,2001,21(4):293-301.
[5] Tekin M,Jackson-Cook C,Buller A,et al. Fluorescence in situ hybridization detectable mosaicism for Angelman syndrome with biparental methylation[J]. Am J Med Genet,2000,95(2):145-149.
[6] Cotter PD,Musci TJ,Norton ME. Rapid prenatal diagnosis in translocation carriers by interphase FISH with chromosome-specific subtelomere probes[J]. Am J Med Genet A,2003,122(1):1-5.
[7] 赵欣荣,吴怡,韩旭,等. 荧光原位杂交产前诊断染色体异常的临床应用[J]. 中国优生与遗传杂志,2012,20(5):46-47.

(收稿日期:2014-12-10)