

## • 论 著 •

## 颗粒增强透射比浊法测定胱抑素 C 方法学评价

王欣欣, 陈美珺<sup>△</sup>

(福建省厦门市厦门大学附属中山医院检验科, 福建厦门 361000)

**摘要:** 目的 用颗粒增强透射比浊法(PETIA)测定血清中胱抑素 C(CysC)水平, 评价该法用于检测血清中 CysC 水平的可行性。方法 用 PETIA 检测试剂盒在 Cobas 8000 全自动生化分析仪上测定血清 CysC 水平, 对方法的不精密度、灵敏度、线性范围等进行评价, 并与 CysC 颗粒增强散射比浊法检测结果进行相关性分析, 同时对其参考区间进行验证。结果 低值样本和高值样本的批内不精密度 CV 分别为 3.67%, 1.15%, 批间不精密度 CV 分别为 4.08%, 1.53%; 准确度的测定偏差仅为 -1.25%; 此试剂盒检测 CysC 灵敏度为 0.07 mg/L; CysC 浓度在 0.2~8.0 mg/L 范围内检测线性良好; 与西门子德灵颗粒增强散射比浊法(PENIA)比较有良好的相关性  $Y = 0.9458X + 0.0486$ ,  $r^2 = 0.9913$ ,  $r = 0.9956$ , 40 例健康体检者样本的检测值仅有 2 例在厂家提供的参考区间之外, 90% 以上的观测值在待验证区间之内。结论 颗粒增强透射比浊法用于定量检测人血清 CysC 水平, 具有简便易行、快捷价廉、准确可靠的优点, 适用于在日常临床检测中推广应用。

**关键词:** 胱抑素 C; 颗粒增强透射比浊法; 自动生化分析仪

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2015.12.031

文献标识码:A

文章编号: 1673-4130(2015)12-1710-03

**Establishment of automated particle-enhanced turbidimetric immunoassay for  
the measurement of human and evaluation on methodology**

Wang Xinxin, Chen Meijun<sup>△</sup>

(Department of Clinical laboratory, Zhongshan Hospital Affiliated to Xiamen University, Xiamen, Fujian 361000, China)

**Abstract: Objective** To evaluate methodologically particle-enhanced turbidimetric immunoassay (PETIA) for determining quantitatively Cystatin C. **Methods** Cystatin C was determined quantitatively with PETIA by Cobas 8000 automatic biochemical analyzer, and imprecision, veracity, sensitivity, linearity range of the method were investigated. The correlation of fresh serum sample results between PENIA and PETIA was analyzed. The reference interval was verified. **Results** The within-run CV imprecision of samples with low and high concentration of adiponectin was 3.67% and 1.15% respectively, the between-run CV imprecision of samples with low and high concentration of adiponectin was 4.08% and 1.53% respectively. The accuracy of the measurement deviation was only -1.25%. The sensitivity was 0.07 mg/L. When the adiponectin concentration was between 0.2~8.0 mg/L, the method showed good linearity. A strong correlation between PETIA and PENIA was confirmed ( $Y = 0.9458X + 0.0486$ ,  $r^2 = 0.9913$ ,  $r = 0.9956$ ). Among 40 cases of healthy physical examination sample, 2 cases were with cystatin C level out of the reference range supplied by reagent kit. The values that were more than 90% in validation interval. **Conclusion** The PETIA assay is a convenient, rapid, cheap, accurate and reliable method for quantitating the human serum concentration of adiponectin. This assay is suitable for clinical routine analysis.

**Key words:** cystatin C; particle-enhanced turbidimetric immunoassay; automated biochemistry analyzer

血清胱抑素 C(CysC)又名  $\gamma$ -微量蛋白和  $\gamma$ -后球蛋白, 是由研究者在 1983 年首次在鸡蛋清中分离纯化得到, 分子量仅为  $13.3 \times 10^3$ , 它是一种碱性非糖化蛋白质, 广泛存在于有核细胞和体液中, 肾小球滤过是其唯一清除方式, 近年研究发现 CysC 是一种反映肾小球滤过率变化的理想内源性标志物之一<sup>[1]</sup>。目前的检测技术主要有 1994 年 Kyhse-Andersen 等<sup>[2]</sup> 报道的颗粒增强透射免疫比浊法和 1997 年 Finney 等<sup>[3]</sup> 报道的颗粒增强散射免疫比浊法, 颗粒增强透射比浊法是一种新兴的检测技术, 具有灵敏度较高、稳定性好、方便快速、自动化的优点<sup>[2]</sup>, 笔者用宁波美康生物科技股份有限公司推出的胶乳增强免疫比浊 CysC 测定试剂盒, 依据美国临床实验室标准化协会(NCCLS)颁发的文件, 使用 cobas 8000 全自动生化仪, 对该试剂盒的性能指标进行了全面评价, 探讨其临床实用性。

## 1 材料与方法

**1.1 血清样品** CysC 低值的混合新鲜血清 50 mL(低值样本), CysC 高值的混合新鲜血清 50 mL(高值样本), 分装于 -80 ℃ 保存备用; 线性范围内的低浓度和高浓度的混合新鲜血清; 从本院健康体检人群中筛选健康者 40 名, 男女各 20 名, 年龄 18~60 岁, 纳入标准为 1 个月内无急性感染史; 发育、精神正常, 无心血管肺肾和肝胆胰等器质性疾病, 半年内无输血和大手术史, 2 周内无中毒史, 无毒物及其他有害物质接触史, 女性不在妊娠期及哺乳期, 不饮酒、不抽烟、无糖尿病、痛风病史, 体质正常 3 个月内未口服避孕药 15 周岁以上无糖尿病冠心病高血压痛风等家族史。采集空腹静脉血 2 mL, 离心后分离血清。

**1.2 仪器与试剂** cobas 8000 全自动生化分析仪(由罗氏公

司提供),德灵 BN II 特定蛋白仪(由 Simens 公司提供);CysC PETIA 试剂盒(批号 20130802)、CysC 定值质控品(批号 20130923)、CysC 校准品(批号 20130911)购自宁波美康生物科技股份有限公司,CysC PENIA 试剂盒购自 Simens 公司(批号 42651)。

### 1.3 方法

**1.3.1 分析原理** 试剂中含可与 CysC 抗原决定簇结合的包被单克隆抗体的大小均匀的乳胶颗粒。加入含有 CysC 的样品后,形成的抗原/抗体复合物的产生使反应混合物的浊度增加。吸光度随时间的变化取决于样品中 CysC 抗原决定簇的多少,并可通过比浊法测定。标准曲线通过 CysC 标准品进行六点定标而得到。

**1.3.2 测试参数** 反应温度:37 °C;分析方法采用 2 点终点法;主波长:546 nm,副波长:700 nm;样品量/R1 /R2 为 2  $\mu$ L/175  $\mu$ L/35  $\mu$ L;反应方向:上升;读点起止点分别在 37 点及 70 点。

**1.3.3 定标参数** 定标参数(主要)采用多点定标。定标类型:6AB,定标公式:spline,定标液浓度(mg/L)为 0.0、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0。

**1.3.4 研究方案** 根据 EP 文件的研究方案,进行批内及批间不精密度、准确度、灵敏度、线性范围等性能指标的评价。具体如下:(1)批内不精密度。根据 NCCLS EP-5A 文件,取低值、高值样本各一份,分别重复测定 20 次,计算测定值的均值( $\bar{x}$ )、标准差( $s$ )和变异系数( $CV$ )。(2)批间不精密度。根据 NCCLS EP-5A 文件,取低值、高值样本各一份,连续测定 10 d,每天测定两次,两次之间的时间间隔不少于 2 h,计算测定值的  $\bar{x}$ 、 $s$  和  $CV$ 。(3)准确度。采用 CysC 校准品,分别测定 3 次,计算均值。(4)灵敏度。将空白样本重复测定 20 次,计算 20 次结果的  $\bar{x}$  与  $s$ 。根据  $\bar{x}+3s$  求得最低检测限(LLD)。取定值 0.2 mg/L CysC 样本,也重复测定 20 次,计算 20 次结果的  $\bar{x}$  与  $s$ 。根据  $0.5 \times LLD$ /定值 CysC 样本测定均值,计算求得灵敏度。(5)线性范围。选取一份接近线性范围上限的 CysC 高值样本和生理盐水的混合血浆测定 3 次后取均值定为预期值,并按 1/40、1/5、2/5、3/5、4/5、5/5 的关系各自配制混合血浆,形成系列评价样品。每个稀释度由低到高重复测定 2 次,再由高到低重复测定 2 次,计算均值。实测值(y 轴)与预期值(x 轴)进行直线回归,计算  $Y=aX+b$ ,验证线性范围。(6)方法对比研究。取 40 份临床血清标本分别用 PETIA 法在罗氏 cobas 8000 全自动生化分析仪上、PENIA 法在 Siemens 德灵特定蛋白仪上进行 CysC 的测定,以 PENIA 为参比方法,PETIA 为实验方法分析结果的相关性。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS13.0 对结果进行统计学分析,分别根据研究方案计算相应的  $\bar{x}$ 、 $s$ 、 $CV$ ,建立直线回归方程,计算相关性。

### 2 结 果

**2.1 批内不精密度** 低值、高值样本分别重复测定 20 次后的  $\bar{x}$ 、 $s$  和  $CV$  见表 1。

**2.2 批间不精密度** 低值、高值样本各一份,连续测定 10 d,每天测定两次,两次之间的时间间隔不少于 2 h。结果见表 2。

**2.3 准确度** CysC 校准品的赋值为 8.00 mg/L,重复测定 3 次的结果分别为 7.87、7.90、7.93 mg/L,测定均值为 7.90

mg/L,偏差仅为 -1.25%。

**2.4 灵敏度** 空白样本重复测定 20 次后,起止吸光度差值结果的  $\bar{x}$  与  $s$  分别为 5.6 mg/L,3.17 mg/L。根据  $\bar{x}+3s$  求得最低检测限(LLD)为 15.11 mg/L。定值 0.5 mg/L CysC 样本 20 次起止吸光度差值结果的  $\bar{x}$  与  $s$  分别为 108.85 mg/L,3.08 mg/L。根据公式,灵敏度为  $0.5 \times 15.11 / 108.85 = 0.07 \text{ mg/L}$ 。

表 1 CysC 试剂批内精密度

样本	$\bar{x}$ (mg/L)	批内 $s$ (mg/L)	批内变异系数 $CV$ (%)
低值样本	0.480	0.018	3.67
高值样本	7.840	0.090	1.15

表 2 CysC 试剂批间精密度

样本	$\bar{x}$ (mg/L)	批间 $s$ (mg/L)	批内变异系数 $CV$ (%)
低值样本	0.480	0.020	4.08
高值样本	7.83	0.120	1.53

**2.5 线性范围** 对 6 个浓度系列 CysC 的实测值(y 轴)与预期值(x 轴)进行直线回归的结果见图 1。从图中可以看到,CysC 实测值与预期值相关性良好, $Y=0.9764X+0.0149$ , $r^2=0.9995$ , $r=0.9998$ ,说明 CysC 浓度在 0.2~8 mg/L 范围内线性良好。

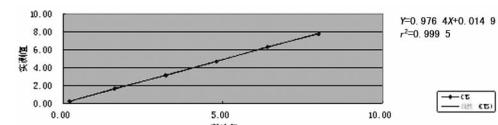


图 1 梯度浓度 CysC 实测值与预期值直线回归分析

**2.6 方法对比研究** 分别用 CysC PETIA 与 CysC PENIA 试剂盒检测 40 例临床血清标本的 CysC 水平,以 PENIA 为参比方法,PETIA 为实验方法进行相关回归分析,两者的相关性如图 2 所示, $Y=0.9458X+0.0486$ , $r^2=0.9913$ , $r=0.9956$ 。

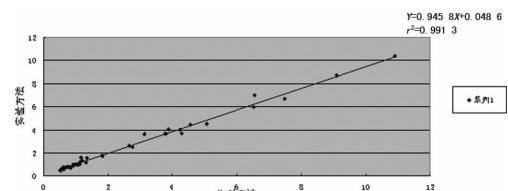


图 2 CysC 试剂对比检测相关分析

**2.7 参考区间** 所选择 18~60 岁健康人新鲜血清样本男、女各 20 份,检测结果显示,40 例样本的观测值仅有 2 例(1.04 mg/L,0.514 mg/L)在厂家提供的参考区间之外,90%以上的观测值在待验证区间之内。考虑到本实验室的服务人群与厂家建立参考区间的人群相近,厂家提供的参考区间经以上步骤验证后可以转移至本实验室使用。

### 3 讨 论

目前,临幊上广泛用來评估肾小球滤过率的指标主要有血肌酐、内生肌酐清除率、血清  $\beta$ -微球蛋白、尿素氮等,但这些内源性指标在检测过程中经常受到许多非肾性因素的干扰,故在评估 GFR 时准确度不高,不能作评估肾小球滤过率的理想指标。CysC 在多数人体组织中稳定表达,其特点是相对分子质

量小,带正电荷,可自由通过肾小球基底膜,在近曲小管被重吸收,且被完全代谢,无肾小管的分泌,在组织中产生的速率恒定,排出只受肾小管滤过率的影响。不受性别、年龄、饮食、炎症、恶性肿瘤、肌肉、血脂、肝脏疾病等其他因素的干扰。因此,血浆或血清中的 CysC 也就成为反映肾小球滤过率的一个非常好的标志物<sup>[4-7]</sup>。

由于血清 CysC 浓度较低<sup>[8]</sup>,故其分析方法需要较高的灵敏度和特异度。放射免疫法(RIA)、酶联免疫试验(ELISA)等方法,这些技术虽然具有灵敏度高的优点,但重复性差、耗时长、难以实现自动化。PENIA 法因其灵敏度高、线性范围宽、自动化程度高、检测快速、精密度好而在临床应用越来越广泛<sup>[9]</sup>,但该方法需要专用特定蛋白分析仪和配套的原装试剂,导致检测成本较高,收费标准高,患者检测费用负担较重,不适合在基层推广。这些大大限制了 CysC 检测的推广应用。

本文主要是对宁波美康生物科技股份有限公司 PETIA CysC 检测试剂盒进行性能评价及比对研究。不精密度研究结果显示,低值样本和高值样本的批内不精密度 CV 分别为 3.67%,1.15%,批间不精密度 CV 分别为 4.08%,1.53%,准确度试验的偏差仅为-1.25%,说明此试剂盒重复性好、准确度高,与 Kyhse-Andersen 等<sup>[2]</sup>的研究一致。主要是因为用此方法检测 CysC 水平时,标本无需预处理,吸样及样本与试剂的混匀、反应、比浊等步骤,实现完全自动化,极大避免了操作误差。灵敏度的研究结果表明,本 CysC 检测法灵敏度较高,为 0.07 mg/L,相对于普通免疫比浊法的灵敏度有质的飞跃。主要是因为此法采用抗人 CysC 单克隆抗体包被微球,将抗原抗体反应放大后再进行测定。从线性范围的实验看,当 CysC 浓度在 0.2~8 mg/L 时,本试剂盒检测结果具有良好的线性关系  $Y=0.9764X+0.0149, r=0.9998$ ,完全能满足人 CysC 检测的需要。在对 CysC 检测比对研究中,以 CysCPENIA 法作为本研究的参比方法,以 PETIA 试剂盒为实验方法,研究两种方法的相关性。结果表明,两种方法比较所得回归方程为  $Y=0.9458X+0.0486, r^2=0.9913, r=0.9956$ ,两种方法相关性较好。

国际临床化学协会提出:常规方法应具有实用性和可靠性两方面的性能指标,实用性应包括微量快速,便于急诊,费用低廉,应用安全,可靠性包括实验方法的精密度、准确度、检测能力等。不难看出,能适应日常临床工作需要的实用型试剂盒除

了结果准确可靠外,必然还要满足操作简便易行、自动化程度高。由于本文所述试剂盒检测 CysC 灵敏度高、准确度好、重复性好,测试时间短(10 min),自动化程度高,可以在普通生化仪上进行检测,较 PENIA 方法有更高的临床应用普及优势,更适于作为临床诊断工作中 CysC 检测的常规方法<sup>[10]</sup>。

## 参考文献

- [1] 刘莲琴. 脱抑素 C 评价肾小球滤过率作用的研究[J]. 中国医药导报, 2010, 11(7): 23-24.
- [2] Kyhse-Andersen J, Schmidt C, Nordin G, et al. Serum cystatin C, determined by a rapid, automated particle-enhanced turbidimetric method, is a better marker than serum creatinine for glomerular filtration rate[J]. Clin Chem, 1994, 40(10): 1921-1926.
- [3] Finney H, Newman DJ, Gruber W, et al. Initial evaluation of cystatin C measurement by particle-enhanced immunonephelometry on the Behring nephelometer systems (BNA, BN II)[J]. Clin Chem, 1997, 43(6 Pt 1): 1016-1022.
- [4] Peralta CA, Katz R, Sarnak MJ, et al. Cystatin C identifies chronic kidney disease patients at higher risk for complications[J]. J Am Soc Nephrol, 2011, 22(1): 147-155.
- [5] Stevens LA, Coresh J, Schmid CH, et al. Estimated GFR using serum cystatin C alone and in combination with serum creatinine: a pooled analysis of 3418 individuals with CKD[J]. Am J Kid Dis, 2008, 51(1): 395-406.
- [6] 蔡钢强, 堀敬. 脱抑素 C 的生物学特性及临床应用评价[J]. 国际检验医学杂志, 2006, 27(5): 457-461.
- [7] Murty MS, Sharma UK, Pandey VB, et al. Serum cystatin C as a marker of renal function in detection of early acute kidney injury [J]. Indian J Nephrol, 2013, 23(3): 180-183.
- [8] 刘爱兵, 李玲, 李红梅, 等. 北京地区健康人血浆胱抑素 C 水平及参考区间 [J]. 现代检验医学杂志, 2009, 24(10): 116-118.
- [9] Al-Turkmani MR, Law T, Kellogg MD. Performance evaluation of a particle-enhanced turbidimetric cystatin C assay on the Hitachi 917 analyzer[J]. Clin Chim Acta, 2008, 398 (1/2): 75-77.
- [10] Hossain MA, Emara M, Mosehli H, et al. Comparing Measures of Cystatin C in Human Sera by Three Methods[J]. Am J Nephrol, 2008, 29(5): 381-391.

(收稿日期:2015-01-18)

(上接第 1709 页)

- [4] Catovsky D, Mayutese E. The classification of acute leukemia[J]. Leukemia, 1992, 6(2): 1.
- [5] Bene MC, Castoldi G, Knapp W, et al. Proposal for the immunological classification of acute leukemia [J]. Leukemia, 1995, 9(1): 1783-1786.
- [6] 李良琼, 李胜堂, 王长本, 等. 重庆渝东地区 1997~2006 年白血病分型及现况分析[J]. 现代肿瘤医学, 2008, 16(10): 1779-1717.
- [7] 周帆, 李建勇, 薛永权, 等. 形态学、免疫学和细胞遗传学分型对急性白血病的诊断价值[J]. 上海医学, 1997, 12(1): 713-714.
- [8] Testa U, Torelli GF, Riccioni R, et al. Human acute stem cell leukemia with multilineage differentiation potential via cascade activation of growth factor receptors[J]. Blood, 2002, 99(12): 4634-4637.

- [9] Paietta E. Expression of cell surface antigens in acute promyelocytic leukemia[J]. Best Pract Res Clin Haematol, 2003, 163(1): 369-385.
- [10] 王兴兵, 郑金娥, 谷俊侠, 等. 成人急性髓细胞白血病免疫分型与细胞遗传学及临床特征的关系[J]. 癌症, 2005, 24(6): 667-671.
- [11] 刘斌, 李睿, 吴辉菁, 等. 急性白血病 LY+AML 型和 MY+A1IJ 型预后因素的临床研究[J]. 中国实验血液学杂志, 2007, 15(2): 421.
- [12] Casanovas RO, Slimane FK, Garand R, et al. Immunological classification of acute myeloblastic leukemia: relevance to patient outcome[J]. Leukemia, 2003, 17(3): 515.

(收稿日期:2015-01-10)