

• 论 著 •

肝素对肌酸激酶及其同工酶测定干扰评价

肖华勇,聂 滨

(宜宾市第二人民医院检验科,四川宜宾 644000)

摘要:目的 应用美国临床实验室标准委员会(CLSI)EP7-A2文件评价肝素对速率法测定肌酸激酶(CK)及其同工酶(CK-Mb)的干扰,明确干扰物质带来的结果差异,确保分析方法性能符合临床要求。方法 根据 CLSI EP7-A2 文件第一种方案“干扰筛选”(将潜在干扰物添加到样本中评价干扰效应),使用四川迈克生物科技有限公司的 CK 及其 CK-Mb 测定试剂盒同时测定 4 例患者血清样本和肝素锂抗凝血样本的 CK、CK-Mb,对两种样本的 CK、CK-Mb 结果进行配对差异试验,对有差异的结果进行剂量效应试验。结果 迈克试剂测定血清和肝素抗凝血浆两种样本 CK、CK-Mb 的结果差异有统计学意义($P < 0.05$),配对差异试验显示肝素在低浓度 CK、CK-Mb 时存在负干扰,而高浓度时不存在干扰。剂量效应试验结果显示肝素在不同浓度时对 CK、CK-Mb 测定的干扰为非线性函数。结论 高浓度(31.25 U/mL)肝素可对迈克公司的 CK、CK-Mb 试剂产生负干扰,当检测该种项目时应尽量使用血清标本。

关键词:干扰试验; 肝素; 肌酸激酶; 肌酸激酶及其同工酶

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.09.042

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)09-1264-03

Evaluation of interference of heparin on determination of CK and CK-Mb

Xiao Huayong, Nie Bin

(Department of Clinical Laboratory, Yibin Municipal Second People's Hospital, Yibin, Sichuan 644000, China)

Abstract: Objective To evaluate the interference of heparin on the determination of creatine kinase(CK) and creatine kinase isoenzyme(CK-Mb) by the rate method according to EP7-A2 document from Clinical Laboratory of Standards Institute(CLSI), and to determine the difference brought about by the interference material for ensuring that the analytical performance meets the clinical requirement. **Methods** According to “the interference screening test”(adding the potential interference material into the sample for evaluating the interference effect) as the first scheme of CLSI EP7-A2 document, the CK and CK-Mb reagent kits provided by Sichuan Mike biological technology Co., Ltd., which were used for simultaneously determining the serum specimens and the heparin lithium anticoagulation blood samples in 4 patients. The CK and CK-Mb detection results were performed the paired difference test. The results with difference were performed the dose-effect test. **Results** The CK and CK-Mb determination results in the two kinds of sample by the Mike reagents had statistical differences ($P < 0.05$), the paired difference test showed that heparin had the negative interference in low concentrations of CK and CK-Mb and had no interference in high concentration. The dose-effect test showed that the interference of heparin in different concentrations on the CK and CK-Mb determination was the non-linear function. **Conclusion** The high concentration heparin(31.25 U/mL) generates the negative interference on the CK and CK-Mb reagents made by Sichuan Mike Biological Technology Co., Ltd., so the serum blood specimen should be used whenever possible when testing CK and CK-Mb.

Key words:interference test; heparin; creatine kinase; creatine kinase isoenzyme

根据四川迈克生物科技有限公司生产的 CK 及其 CK-Mb 测定试剂盒说明书,采用血清及 12.5 U/mL 肝素抗凝样本均可,然而在实际工作中发现两者的反应曲线大不相同,并且部分较低浓度 CK、CK-Mb 用肝素抗凝样本做出的结果为负值。由此推测肝素可能对 CK、CK-Mb 测定有干扰(非目标物质影响样本特性或检测方法,使待测物在一定浓度出现有临床意义的偏倚)^[1]。根据美国临床实验室标准委员会(CLSI)EP7-A2 文件评价肝素对速率法测定 CK 及 CK-Mb 的干扰进行了评价^[2]。

1 材料与方法

1.1 材料 同时分别收集 4 例患者的不抗凝血(无黄疸、脂血、溶血)作为基础样本,使其 CK 低浓度为 100 U/L、高浓度为 240 U/L;CK-Mb 低浓度为 25 U/L、高浓度为 90 U/L。四川普什医疗器械公司提供肝素锂(浓度 6 250 U/mL),加蒸馏水稀释至 625 U/mL 作为肝素锂贮存液。配对差异试验测试

样本和对照样本取基础样本分为等量 2 份,一份加入肝素锂储存液,使肝素锂浓度 62.5 U/mL 作为测试样本;另一份加入等量生理盐水作为对照样本。剂量效应试验测试样本取基础样本和肝素锂储存液,使肝素锂浓度为 0、62.5 U/mL,将其按 1:1、1:3、3:1 比例混合配成肝素锂浓度分别为 31.25、15.625、46.875 U/mL 的样本,上述 5 个浓度样本作为测试样本。

1.2 方法

1.2.1 测定原理 磷酸肌酸十二磷酸腺苷在 CK 作用下产生三磷酸腺苷,三磷酸腺苷+葡萄糖在己糖激酶作用下生成葡萄糖-6-磷酸,葡萄糖-6-磷酸+氧化型辅酶 II + 在葡萄糖-6-磷酸脱氢酶作用下产生还原型辅酶 II,通过检测 340 nm 吸光度变化率,CK 活力与每分钟吸光度变化率成正比。CK-Mb 原理同 CK,只是用抗 B 亚单位抗体屏蔽 B 亚单位活力。

1.2.2 配对差异试验 用 CK 及 CK-Mb 试剂盒同时分别检测 4 例患者的不抗凝血和肝素锂抗凝血样本的 CK 及 CK-

Mb, 对两种样本的 CK 及 CK-Mb 进行配对差异试验, 判断肝素是否对 CK 及 CK-Mb 检测有干扰。(1) 干扰试验判断标准: 本研究基于临床接受限和被分析物检测试剂盒的分析性能, 确定 10% 偏倚为最大允许干扰值 d_{max} ;(2) 分析物浓度: 干扰至少应该在 2 种医学决定水平被评估, 在本研究中分析物浓度分别在参考值上限以及医学决定水平, 即 CK 在 100、240 U/L, CK-Mb 在 25、90 U/L, 2 个水平评估肝素对 CK 及 CK-Mb 测定的干扰;(3) 干扰物浓度: 据 EP7-A2 文件, 疑为干扰物时, 血清、血浆和全血中抗凝剂浓度应达到正常剂量的 5 倍, 普什公司正常的肝素锂浓度 12.5 U/mLg/L, 在干扰试验中 5 倍即为 62.5 U/mL; (4) 重复次数的确定 首先计算最大允许干扰值 (d_{max})/批内标准差 (s) 比值, 然后查 d_{max}/s 与重复次数对应表, 可得出 CK 及 CK-Mb 不同浓度水平的重复测定次数。 d_{max} 本研究参照 CLIA'88 设定, CK 和 CK-Mb 均为基础样本均值的 10% 为最大允许误差;(5) 检测要求 按交互顺序检测测试样本和对照样本, 中间穿插额外样本, 使基础样本免受干扰;(6) 干扰效应分析 分别将所得数据进行干扰效应的点估计, d_{obs} ($d_{obs} = \text{test} - \text{control}$) 即测试样本均值和对照样本均值之差与临界值 d_c 的比较, 如果点估计 $d_{obs} > d_c$, 说明存在干扰。 $d_c = (dn_{null} + sZ_{1-\alpha/2}) / \sqrt{n}$ 计算临界判断值的 d_c , 式中 s 为批内标准差, n 为重复次数, dn_{null} 无效假设规定的值, 通常为 0; $Z_{1-\alpha/2}$ 正态分布双侧检验 $100(1-\alpha)\%$ 的百分位值。干扰效应的 95% 可信区间 (CI) = $(\text{test} - \text{control}) \pm 1.96 \times s$, 式中 $\text{test} - \text{control}$ 为试验组与对照组均数之差; 0.975, $n-1$ 来源于 t 检验值表 0.975 和 $n-1$ 自由度的值。

1.2.3 干扰剂量效应试验 (1) 重复次数的确定和检测要求 同配对差异试验;(2) 如果数据随机分布, 成一条直线, 可用最小二乘法进行回归分析, 确定其斜率、截距、标准误 (S_y, x) 在图上绘制回归线; 如果各浓度水平的干扰不是一个线性函数, 绘图时显示是弯曲的, 则描述干扰物浓度的干扰程度。

1.3 仪器与试剂 日本日立 7600-010 生化分析仪, 按仪器厂商要求进行校准和维护, 精密度和准确度、携带污染率等验证后符合仪器说明书要求, 每日做高、低两个浓度水平质控在控。四川迈克生物科技有限公司生产的 CK、CK-Mb 测定试剂盒, 试剂批号均为 0214601。CK 校准品为迈克公司配套校准品, 批号为 1213051; CK-Mb 校准品为迈克公司试剂盒说明书提

供理论 F 值, 质控品高、低浓度由德赛诊断系统(上海)有限公司提供, 批号分别为 16714、16715。不抗凝管及肝素锂抗凝管均由四川普什医疗器械公司生产。

2 结 果

2.1 配对差异试验结果

2.1.1 重复次数的确定 计算 d_{max}/s 比值。低浓度基础样本 20 次测定的 CK 均值为 101.0 U/L, d_{max} 为 10.1 U/L, S 为 1.16 U/L; CK-Mb 均值 24.3 U/L, d_{max} 为 2.4 U/L, S 为 0.49 U/L。高浓度基础样本 20 次测定的 CK 均值 241.7 U/L, d_{max} 为 21.6 U/L, S 为 3.16 U/L; CK-Mb 均值 89.3 U/L, d_{max} 为 8.9 U/L, S 为 1.19 U/L; CK 及 CK-Mb 高、低浓度水平的 d_{max}/s 均大于 3, 查表 1 可知 CK 及 CK-Mb 高、低浓度水平的重复次数为 3 次。

2.1.2 干扰效应结果 利用日立 7600-010 检测 CK 及 CK-Mb 时, 在 62.5 U/mL 肝素的情况下, 高、低浓度 CK、CK-Mb 的干扰效应结果见表 2。在低高浓度 CK、CK-Mb 在 0.5 g/L 肝素下 d_{obs} 均大于 d_c 以及 d_{max} , 表明肝素引起 CK、CK-Mb 检测有负干扰。干扰效应分别是低浓度 CK 95% CI (−15.3 ± 4.1) U/L; 高浓度 CK 95% CI 为 (−25.3 ± 11.1) U/L; 低浓度 CK-Mb 95% CI 为 (−17.7 ± 1.7) U/L; 高浓度 CK-Mb 95% CI 为 (−11.3 ± 4.2) U/L。由低浓度 CK、CK-Mb 95% CI 上限小于 d_{max} 可知, 肝素在低浓度 CK、CK-Mb 可干扰测定; 高浓度 CK、CK-Mb 95% CI 上限大于 d_{max} 可知, 肝素在高浓度 CK、CK-Mb 时不干扰测定。

表 1 d_{max}/s 与重测次数的情况

| d_{max}/s | 重复次数(次) | d_{max}/s | 重复次数(次) |
|-------------|---------|-------------|---------|
| 0.8 | 41 | 1.5 | 12 |
| 1.0 | 26 | 1.6 | 10 |
| 1.1 | 22 | 1.8 | 8 |
| 1.2 | 18 | 2.0 | 7 |
| 1.3 | 16 | 2.5 | 5 |
| 1.4 | 14 | 3.0 | 3 |

表 2 62.5 U/mL 肝素配对差异试验结果 (U/L)

| 组别 | 对照样本 | | | | 测试样本 | | | | d_{obs} | d_c | d_{max} |
|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-----------|-------|-----------|
| | 1 次 | 2 次 | 3 次 | 均值 | 1 次 | 2 次 | 3 次 | 均值 | | | |
| 低浓度 CK | 100.0 | 102.0 | 102.0 | 101.3 | 86.0 | 85.0 | 87.0 | 86.0 | −15.3 | 3.5 | 10.1 |
| 高浓度 CK | 240.0 | 242.0 | 242.0 | 241.3 | 216.0 | 215.0 | 217.0 | 216.0 | −25.3 | 9.6 | 24.1 |
| 低浓度 CK-Mb | 24.0 | 23.0 | 24.0 | 23.7 | 5.0 | 6.0 | 7.0 | 6.0 | −17.7 | 1.5 | 2.4 |
| 高浓度 CK-Mb | 89.0 | 88.0 | 91.0 | 89.3 | 79.0 | 78.0 | 77.0 | 78.0 | −11.3 | 3.6 | 8.9 |

2.2 剂量效应试验结果

2.2.1 重复次数的确定 根据 EP7-A2 文件通用要求, 本研究每个浓度水平的重复次数为 3 次。

2.2.2 剂量效应分析 参照干扰物在血清浓度中影响的最高浓度水平, 对肝素锂贮存液进行相应稀释后, 肝素最高干扰物浓度为 62.5 U/mL。在低浓度 CK、CK-Mb 下, 添加了肝素的样本显现出干扰效应。不同浓度的肝素对低浓度的 CK 和

CK-Mb 产生非线性负干扰。由表 3 可知, 肝素钠浓度为 15.625 U/mL(正常抗凝浓度)的相对偏倚小于最大干扰限 10%, 当肝素钠浓度为 31.25 U/mL 及以上时, CK、CK-Mb 相对偏倚均大于最大干扰限 10%, 尤其以 CK-Mb 干扰最明显。肝素钠浓度为 31.25 U/mL 时, CK、CK-Mb 干扰效应最大, 正常抗凝浓度(15.625 U/mL)可以用肝素钠血浆代替血清标本, 当肝素钠浓度不低于 31.25 U/mL 时, 可在低浓度(CK 100

U/L, CK-Mb 25 U/L) 产生较为严重的负干扰, 见图 1。

表 3 肝素钠 5 个系列浓度对 CK、CK-Mb 检测的偏倚

| 肝素钠浓度 (U/mL) | 低浓度 CK(101.3 U/L) | | 低浓度 CK-Mb(23.7 U/L) | |
|-----------------|-------------------|-------------|---------------------|-------------|
| | 绝对偏倚 (U/L) | 相对偏倚 (%) | 绝对偏倚 (U/L) | 相对偏倚 (%) |
| 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| 15.625 | 4.4 | 4.3 | 2.2 | 9.3 |
| 31.25 | 11.3 | 11.2 | 14.3 | 60.3 |
| 46.875 | 12.2 | 12.0 | 15.6 | 65.8 |
| 62.5 | 16.6 | 16.4 | 15.7 | 66.2 |

3 讨 论

CK 通常存在于动物的心脏、肌肉以及脑等组织的细胞浆和线粒体中, 是心肌损伤指标之一^[3], 尤其 CK-Mb 更是原来诊断心梗的“金标准”, 该两个项目误差可造成对心梗的误诊。

样本检测结果与真值间的偏离主要有系统偏差、不精度、干扰等情况。通过 EP7-A2 文件第一种方案“干扰筛选”(将潜在干扰物添加到样本中评价干扰效应)筛选潜在的干扰物质, 量化干扰效应, 证实潜在干扰物对样本中的干扰, 确认分析方法对干扰物质的敏感性, 评估潜在的风险, 做出有意义的干扰声明, 确保分析方法符合临床要求。

由配对差异试验、剂量效应试验结果可知, 肝素锂正常抗凝浓度(15.625 U/mL)时肝素抗凝剂不会对迈克公司 CK、CK-Mb 试剂产生负干扰。但是由于采血困难及采集时间不够等多种原因, 在临幊上护士抽取肝素抗凝管时很难达到 5 mL, 使肝素浓度达到或超过 31.25 U/mL。在剂量效应试验也发现用当肝素浓度在 31.25 U/mL 及以上时可使 CK 及 CK-Mb 结果严重偏低产生负干扰。确切机制有待进一步探讨, 当检测该种项目时应尽量使用血清标本。

综上所述, 标本质量对临幊化学检验的干扰必须得到广大临幊工作者的高度重视, 除试剂厂家正确选择消除干扰的方法外, 血清、肝素血浆等溶血、黄疸、脂血等的样本状态也应随检验结果一并报告亦非常必要^[4-9]。在日常工作中会遇到各

(上接第 1263 页)

- 国汉族人群伊马替尼耐药 Ph+ 急性淋巴细胞白血病与慢性髓性白血病患者中的分布及特点比较[J]. 中华血液学杂志, 2013, 34(1): 21-25.
- [3] 王永锋, 李建华, 刘玉军, 等. Beckman-coulter AC. T5diff 血液分析仪白细胞研究参数在白血病筛查中的应用[J]. 现代肿瘤医学, 2012, 20(12): 2620-2622.
- [4] Pearce MS, Salotti JA, Little MP, et al. Radiation exposure from CT scans in childhood and subsequent risk of leukaemia and brain tumours: a retrospective cohort study[J]. Lancet, 2012, 380(40): 499-505.
- [5] 张时民. 五分类法血细胞分析仪测定原理和散点图特征[J]. 中国医疗器械信息, 2008, 14(12): 1-9.
- [6] 吴小梅, 张秋萍. Sysmex XE-5000 全自动血细胞分析仪计数网织红细胞与手工法结果的比对分析[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(16): 2013-2015.

种各样的干扰因素, 造成检测结果不准确。对各干扰因素进行分析判断及纠正处理并不是一件容易的事情, 必须建立规范而正确的对各干扰因素的分析判断及纠正程序, 严格按照程序操作, 消除干扰, 使检测结果准确可靠^[10-12]。

参考文献

- [1] 冯仁丰. 临幊检验质量管理技术基础[M]. 2 版. 上海: 上海科学文献出版社, 2007: 177-185.
- [2] Clinical and Laboratory Standards Institute. Ep7-A2 Interference testing in clinical chemistry[S]. Wayne, PA, USA: CLSI, 2005.
- [3] 曹传勇, 李红波, 郑健彬, 等. 血清肌酸激酶同工酶的质量与活性测定在急性心肌梗死诊断中的价值[J]. 成都医学学报, 2012, 2(1): 131-135.
- [4] 施金俏, 俞北伟. 应用 EP7 文件对性激素测定的干扰评价[J]. 检验医学, 2006, 21(3): 289-291.
- [5] 郭龙华, 崔瑾, 陈茶, 等. 肝素对亮氨酸氨基肽酶测定的干扰评价[J]. 检验医学, 2011, 21(8): 189-191.
- [6] 周汉义. 3 种抗凝剂对微量元素检测结果的影响分析[J]. 现代中西医结合杂志, 2011, 3(1): 421-423.
- [7] 马卫红, 程钊, 李建军. 二代 α -L-岩藻糖苷酶试剂抗肝素干扰能力评价及临床应用[J]. 中国煤炭工业医学杂志, 2010(4): 568-570.
- [8] 李荣. 不同 HIV-ELISA 诊断试剂检测结果比较[J]. 中国社区医师: 医学专业, 2011, 22(1): 248-249.
- [9] 李琦, 徐竹蔚, 宋朝君, 等. 抗 AFP 单克隆抗体夹心 ELISA 检测试剂盒的研制及应用[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2011, 8(2): 921-922.
- [10] 陈伟才. 不同抗凝剂对乙肝表面抗体检测结果的影响[J]. 现代医学, 2010, 10(10): 24-25.
- [11] 张根仓, 张明霞, 赵黎娟, 等. 血液保养液与肝素抗凝剂对 HBsAg. ELISA 检测结果的影响临床输血与检验[Z]. 2010: 654-655.
- [12] 曾素根, 余江, 曾婷婷, 等. Sysmex 公司血液分析仪的干扰因素分析判断及处理程序[J]. 检验医学, 2010, 25(3): 244-246.

(收稿日期: 2015-01-18)

- [7] Kleine TO, Nebe CT, Lower C, et al. Cell analysis in cerebrospinal fluid (CSF) using Sysmex hematology analyzers XT-4000i and XE-5000: evaluation with CSF controls of the Joint German Society for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (DGKL)[J]. Cytometry A, 2012, 81(3): 255-264.
- [8] 武换玲, 高文峰, 李元堂, 等. 骨髓增生异常/骨髓增殖性肿瘤的临床和实验室特征分析[J]. 中华检验医学杂志, 2012, 35(9): 832-837.
- [9] 马晓莉, 王彬, 郭海英, 等. 急性淋巴细胞性白血病患儿疏嘌呤耐受性研究[J]. 中华儿科杂志, 2010, 48(4): 289-292.
- [10] Van Maele-Fabry G, Lantin AC, Hoet P, et al. Residential exposure to pesticides and childhood leukaemia: a systematic review and meta-analysis[J]. Environ Int, 2011, 37(1): 280-291.

(收稿日期: 2015-01-14)