·综　　述·

血清酶学检测标准化和溯源性进展

齐天琪[1,2]综述，汪　静[2]，陈文祥[2△]审校
（1. 中国医学科学院北京协和医学院，北京 100730；2. 北京医院国家老年医学中心/卫生部临床检验中心，北京 100730）

摘　要： 血清酶学作为辅助诊断多种重要疾病的生化项目，其检测标准化和溯源性至关重要。国际临床化学联合会已建立了 7 种血清酶的参考测量程序，并推荐厂家试剂校准品溯源至酶学参考系统。通过研发具互通性并由参考方法赋值的参考物质，在室间质评活动中引入正确度评估计划，推动具溯源性的试剂校准品的生产，扩大其在医学实验室中的占有率，是促进酶学标准化进程的有效手段。

关键词：酶学；　标准化；　溯源性
DOI：10.3969/j.issn.1673-4130.2018.16.031　　**中图法分类号：**R446.1
文章编号：1673-4130(2018)16-2046-04　　**文献标识码：**A

血清酶作为常规生化检测项目中排名前二十的项目，在诊断和监测肝脏、胰腺、骨骼肌和骨相关疾病过程中发挥着重要作用。2012 年，1 项由我国 270 家医院参与的调查显示[1]，在 628 个检验项目中，包括丙氨酸氨基转移酶（ALT）、天门冬氨酸氨基转移酶（AST）、γ-谷氨酰基转移酶（γ-GGT）、乳酸脱氢酶（LDH）、肌酸激酶（CK）、α-淀粉酶（AMY）、碱性磷酸酶（ALP）和脂肪酶等 10 个酶学项目占检测总量的 12.3%。2002 年，欧洲参考物质与测量研究所（IRMM）评估全球 950 家医学实验室发现[2]，γ-GGT 在 35 U/L 处的偏倚为 −60%～30%。2005 年，1 项由意大利 60 多家实验室参与的调查显示[3]，在使用相同原理检测 ALT 的实验室中，男性参考区间上限变化范围为 40～72 U/L，下限变化范围为 0～30 U/L。明显的检测偏倚和不同参考区间造成的差异极大地影响着临床决策及患者安全。这就要求临床实践中血清酶学测量必须标准化。通过建立完整的溯源链，将实验室检测结果溯源至国际认可的参考物质或参考方法，从而减小临床样本的检测偏倚，已成为全球共识[4]。本文综述了近年酶学检测标准化和溯源性的最新进展。

1　酶学检测标准化和溯源性的现状

催化活性是血清酶学检测的重要特性，它不同于物质的量浓度检测，具有方法依赖性。因此被测量的描述不仅需要项目、单位和样本类型，还需详述检测程序。不同检测环境和条件下，即使相同样本也能产生不同结果。因此，溯源链顶端的参考测量程序需明确定义测定条件[5]。之前专家认为实现血清酶测定结果可比性的重要方法是推广优化的检测方法[6]，然而全球范围仅使用单一方法检测特定酶活性浓度是很难实现的[5]。也有观点认为，酶学检测结果可以用参考上限的倍数表示，但这种表示方法会增加检测结果的离散性[7]。因此，当前酶学标准化的共识是通过建立不同系统结果的溯源性，以实现不同系统结果的可比性[8-9]。

1.1　一级参考测量程序　为促进血清酶学参考测量系统的建立，国际临床化学联合会（IFCC）于 1997 年成立了酶学工作组。该工作组的首要任务就是选出恰当的参考测量程序，为检测结果提供溯源依据。他们将之前推荐的 30 ℃活性测定温度调整为 37 ℃，重新评估了孵育时间和线性，并制定成标准程序文件（SOP）。为保证参考测量较小的不确定度，所有相关技术包括称量、定容、反应体系的 pH、温度及分光光度测定均需严格控制[10]。自 2002 年起，国际检验医学溯源联合委员会（JCTLM）列表陆续收录了 IFCC 推荐的 ALT、AST、γ-GGT、AMY、LDH 和 ALP 等 7 种血清酶的参考测量程序[11-17]。

1.2　认可参考实验室　JCTLM 列表已收录了 9 家经过 ISO 17025 和 15195 认可的酶学参考实验室，其中 4 家来自欧洲，5 家来自中国。这些实验室能提供严格依照 SOP 的酶学参考测量技术，且检测结果均能落在指定不确定度范围内[18]。这些实验室也是验证新的酶学参考测量程序可行性的重要成员。2008 年卫生部临检中心总结我国 7 家实验室运行 IFCC 酶学参考方法情况，结果显示各实验室的批内不精密度均在 1.5%以内，批间不精密度在 2%以内；技术力量已接近国外同类实验室，我国酶学参考实验室网络初步建立[19]。2014 年北京市临床检验中心组织国内 6 家候选酶学参考实验室利用 IFCC 推荐的参考方法，为冰冻混合人血清酶校准品赋值，结果显示 5 项酶的室间变异与同期国际参考实验室室间质评计划的室间变异相近或比其略小，赋值结果满意[20]。

1.3　参考物质　IFCC 酶学工作组的另一个任务就是选出恰当的参考物质，并完成参考物质赋值。目前，JCTLM 列表中由 IFCC 和 IRMM 联合认证的血清酶参考物质只有 AST、γ-GGT 和 AMY 等 3 个项

△ **通信作者**，E-mail：wxchen@nccl.org.cn。

本文引用格式：齐天琪，汪静，陈文祥. 血清酶学检测标准化和溯源性进展[J]. 国际检验医学杂志，2018，39(16)：2046-2049.

目，新一批 ALT、CK 和 LDH 参考物质的复制和特性鉴定仍在进行中[21]。REJ[22]将酶学互通性定义为“不同方法检测酶学参考物质或质控材料的活性浓度具有与患者血清中酶活性浓度相似的数学关系”，参考材料的互通性受很多因素影响，如来源、纯化程序、溶液基质、冻干、稳定剂或其他添加剂等[5]。具有互通性的参考物质作为溯源链中的重要环节，能使临床样本结果溯源至参考测量程序，不再依赖于特定检测方法和系统，是保证酶学正确度传递的关键。而 JCTLM 列表中参考材料的互通性仅在有限的几种方法上得到验证，对于特定的方法如干化学，仍待考察[2]。此外，单一酶学参考材料的数量有限，成本高，难以满足日常检测校准。因此，制备类似人血清的复合酶类参考材料是非常具有前景的。如果找不到合适的参考材料用于校准溯源，一组足够数量的参考方法赋值的单人份血清（血清盘）也能实现校准溯源[2]。

1.4　统一的参考区间　标准化后的检测方法一般会修正现有检测结果，而恰当的生物参考区间将有利于标准化方法的推广，否则可能会对患者检测结果做出错误解释[23]。由于条件限制，单一体外诊断（IVD）厂商或是医学实验室较难获得经过确证的参考区间。而酶学参考测量系统的引入使血清酶检测结果具有了溯源性和可比性，也就能定义具有溯源性的统一生物参考区间，为临床决策提供更准确有效的信息。目前，7 种血清酶具有溯源性的参考区间在白种成年人群和亚裔成年人群中均已建立，但存在一定种族差异[24-26]。而儿童群体中 AST、ALT、LDH 和 γ-GGT 的统一参考区间也已依照类似方法建立[27]。

2　酶学检测标准化的前进之路

2.1　保证检测方法的溯源性　血清酶学参考系统是实现酶学检测结果溯源性的基础。但只有方法特异性与参考方法相同或相近的常规方法才能通过不间断的溯源链实现向参考方法的溯源[5]。溯源性的实现可有效减小酶学的检测偏倚。2006 年，首个酶学溯源性多中心相关研究开展，70 家实验室来自欧洲 3 个国家，采用 6 个生产厂商的检测方法，并以 IFCC 推荐参考测量程序赋值且具有互通性的血清基质材料评价测量结果的溯源性[28]。该研究使用基于生物学变异的最大允许总误差作为评价标准。研究显示，对于 CK，95％以上使用 Abbott、Roche 或 Beckman 系统的实验室结果具有溯源性且满足评价标准；对于 ALT，95％以上使用 Dade、Olympus、Ortho 或 Roche 系统，94％使用 Abbott 系统，89％ 使用 Beckman 系统的实验室也能满足偏倚要求；对于 AST 和 γ-GGT，仅 Dade 和 Olympus 系统能满足要求。同使用 Ortho 系统检测 LDH，意大利和荷兰的检测结果高于参考方法靶值的 2.4 倍，而德国（方法特异性不同于上述两国方法）的检测结果却接近靶值。2014 年，该团队又重新评估了欧洲 4 个国家的酶学测量结果[29]，认为 CK 的标准化结果令人满意，而 GGT 测量有了明显改善；转氨酶、LDH 和 AMY 不同检测方法间的结果不一致明显，来自同一厂商不同用户的结果变异也明显。这可能是因为分析特异性不同的常规方法，无法保证全部溯源至国际认可的参考测量系统。以转氨酶为例，几乎所有的厂商都能生产含和不含磷酸吡哆醛（P-5′-P）的两类试剂，而不含 P-5′-P 试剂的检测结果无法利用酶学参考测量程序进行校准，或是获得恒定的校准系数，这与生物样本多样性有关，即不同生物样本中全酶与脱辅基酶的比例不同。另一文献研究了同种试剂含和不含 P-5′-P 的检测结果[30]，发现不含 P-5′-P 的试剂与酶学参考方法结果比对时，偏倚很难满足要求。据统计，国内医学实验室使用的试剂中除西门子 Dimension 和 Ortho 外，均不添加 P-5′-P。2013 年卫生部临床检验中心采用 3 个水平冰冻新鲜血清样本和 IFCC 参考测量程序评价了国内 165 家实验室 7 项血清酶的检测情况[31]，结果显示 ALT 和 AST 的偏倚分别高达10.1％和 25.1％，均不能满足偏倚要求。再如 AMY 的某些常规方法，已经确定无法溯源至 IFCC 的参考测量程序，主要原因是与 IFCC 方法的底物不同。2015 年，1 项涵盖意大利 73 家实验室的多酶检测方法调查显示[32]，与 2006 年相比，使用 IFCC 推荐原理的检测方法的实验室明显增加。2016 年上述 73 家实验室酶学正确度验证计划显示[33]，排名前 13 位的实验室中，仅 3 家实验室（23％）满足 3 个浓度水平的偏倚要求，仅 1 家实验室的全部检测数据能落在靶值不确定度范围内，研究还显示能否满足偏倚要求与使用的校准品能否正确溯源至 IFCC 参考方法密切相关。

2.2　使用互通的质评物，开展基于正确度的质评活动　目前全球室间质评计划（EQAS）组织机构已基本达成共识，只有严格依照 IFCC 酶学参考测量程序赋值且具有互通性的 EQAS 材料才能正确和客观评价参与实验室的检测能力，否则可能做出错误判断和解释[4,34]。然而，开展满足上述要求的 EQAS 对主办方的技术和经济能力要求较高，这也是限制开展的重要原因。COBBAERT 等[35]利用具备上述特征的 EQAS 材料调查发现，2005－2010 年荷兰酶学标准化工作进展较大，满足偏倚评价标准的实验室比例明显增加，其中 LDH 检测合格实验室从 10％ 增加至 70％，AST 从 40％增加至 60％，ALT 和 γ-GGT 从 70％ 增加至 90％或更高。卫生部临检中心自 2012 年始开展基于酶学正确度的 EQAS 活动，由于国内主流转氨酶试剂基本不添加 P-5′-P，这两项目的正确度评估依然需要分组讨论，不添加 P-5′-P 组仅提供组内均值作为参考值，而不建议与 IFCC 参考测量程序的靶值比对，故这两个项目基于正确度的室间质评活动不能充分发挥作用。而其他国内酶学项目均以 IFCC 参考方法靶值作为正确度验证的比对值。2013 年卫生部临检中心组织的酶学正确度验证计划数据显示[36]，7 个血清酶的偏倚通过率为 48.1％（ALP）至 76.0％（CK），仍有不少实验室检测结果存在偏倚，试剂厂家和医学实验室依然需要高度重视检测方法的

校准溯源性和正确溯源的问题。

2.3 建立可靠的分析性能指标(APS) 除建立和定义酶学参考测量系统外,标准化工作的专业人员需协商建立酶学测量的可靠 APS,以保证检测结果满足临床决策,减小测量误差的影响。2014 年米兰会议推荐修正的 APS 考虑以下 3 种因素模型:第一,基于分析性能对于临床检测结果的影响;第二,基于被测量的生物学变异;第三,基于测量方法的最高等级[37]。

对于血清酶学检测的评价标准,经过认可的权威数据较难得到,而基于生物学变异的因素模型常被考虑。2012 年我国发布的卫生行业标准中酶学项目的 APS 则是综合考虑了生物学变异数据和 80% 三级以上医院所能达到的分析质量水平[38]。CAROBENE 等[39]评估了已出版的 ALT、AST 和 GGT 的生物学变异数据,发现数据收集和统计方法的差异导致数据范围较宽。某些项目生物学变异数据仅来源于有限的几篇甚至 1 篇文献,且统计收集年份久远,数据过于陈旧[40]。因此,考虑将基于生物学变异的数据作为 APS 时,仍需严格评估其可靠程度。

2.4 完善立法,加强监督,提高认识 IFCC 已建立了大量血清酶学测量溯源工具,但国内外对酶学测量标准化实施的监督力度依然不够。如果不能有效地开展标准化工作,即使建立大量的溯源手段也无法保证室间检测结果始终一致。目前,欧洲已强制要求医学实验室的酶学检测方法溯源至参考测量程序或更高级的参考物质,并拟定成法律条例[41]。事实上,JCTLM 数据库不具备法律效力,ISO 15189 认证标准也未明确要求溯源至 JCTLM 数据库的参考测量系统。由于缺乏强制性要求及明确的专业意见,IVD 厂商为适应全球市场,依然针对相同的酶学项目生产不同的 IVD。酶学标准化工作的重要内容也包括促进常规方法检测原理向参考方法靠近。由于实验室人员和临床医生对酶学标准化认识有限,长期的工作与使用习惯也阻碍了新方法的引入,故加大宣传范围,加强监督与监管力度等,以逐步改变观念,改善我国酶学检测试剂溯源性现状。

3 小 结

酶学标准化的道路已经走过近 40 年,国内外大量研究团队为此做出了贡献。酶学标准化和溯源性的理论也越来越多的应用于临床实践中,但国内外血清酶学测量现状依然有提升空间,酶学标准化的过程任重而道远。通过研发具互通性并由参考方法赋值的参考物质,在室间质评活动中引入正确度评估计划,制定可靠的 APS,推动具有溯源性的试剂和校准品的生产,扩大其在医学实验室中的占有率,是促进酶学标准化进程的有效手段。加强监督、提高认识,逐步改变观念,才能更好地改善我国酶学检测溯源性的现状。

参考文献

[1] 钟堃,王薇,何法霖,等. 全国医院检验科临床检验项目基本情况现状调查与分析[J]. 中华检验医学杂志,2015,38(9):637-641.

[2] INFUSINO I, BONORA R, PANTEGHINI M. Traceability in clinical enzymology[J]. Clin Biochem Rev, 2007, 28(4):155-161.

[3] INFUSINO I, SCHUMANN G, CERIOTTI F, et al. Standardization in clinical enzymology: a challenge for the theory of metrological traceability[J]. Clin Chem Lab Med, 2010, 48(3):301-307.

[4] BRAGA F, PANTEGHINI M. Verification of in vitro medical diagnostics (IVD) metrological traceability: responsibilities and strategies[J]. Clin Chim Acta, 2014, 432(6):55-61.

[5] PANTEGHINI M, CERIOTTI F, SCHUMANN G, et al. Establishing a reference system in clinical enzymology [J]. Clin Chem Lab Med, 2001, 39(9):795-800.

[6] SCHMIDT E S, SCHMIDT F W. Standardization by reference methods: a German viewpoint[J]. Clin Chim Acta, 1988, 173(1):9-17.

[7] FÉRARD G, PITON A, MESSOUS D, et al. Intermethod calibration of alanine aminotransferase (ALT) and gamma-glutamyltransferase (GGT) results: application to Fibrotest and Actitest scores[J]. Clin Chem Lab Med, 2006, 44(4):400-406.

[8] PANTEGHINI M. Traceability as a unique tool to improve standardization in laboratory medicine[J]. Clin Biochem, 2009, 42(4/5):236-240.

[9] TRACEABILITY P M. Reference systems and result comparability[J]. Clin Biochem Rev, 2007, 28(3):97-104.

[10] RAMI L, CANALIAS F. An approach to establish the uncertainty budget of catalytic activity concentration measurements in a reference laboratory[J]. Clin Chem Lab Med, 2015, 53(5):743-751.

[11] SCHUMANN G, BONORA R, CERIOTTI F, et al. IFCC primary reference procedures for theMeasurement of catalytic activity concentrationsof enzymes at 37°C. part 2. reference procedurefor the measurement of catalytic concentrationof creatine kinase[J]. Clin Chem Lab Med, 2002, 40(6):635-642.

[12] SCHUMANN G, BONORA R, CERIOTTI F, et al. IFCC primary reference procedures for theMeasurement of catalytic activity concentrationsof enzymes at 37°C. part 3. reference procedurefor the measurement of catalytic concentrationof lactate dehydrogenase[J]. Clin Chem Lab Med, 2002, 40(6):643-648.

[13] SCHUMANN G, BONORA R, CERIOTTI F, et al. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37°C. Part 4. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of alanine aminotransferase[J]. Clin Chem Lab Med, 2002, 40(6):718-724.

[14] SCHUMANN G, BONORA R, CERIOTTI F, et al. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37°C. Part 5. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of aspartate aminotransferase[J]. Clin

Chem Lab Med, 2002, 40(6): 725-733.
[15] SCHUMANN G, BONORA R, CERIOTTI F, et al. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 degrees C. Part 6. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of gamma-glutamyltransferase[J]. Clin Chem Lab Med, 2002, 40(7): 734-738.
[16] SCHUMANN G, AOKI R, FERRERO CA, et al. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37°C. Part 8. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of α-amylase[J]. Clin Chem Lab Med, 2006, 44: 1146-1155.
[17] SCHUMANN G, KLAUKE R, CANALIAS F, et al. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37°C. Part 9: reference procedure for the measurement of catalytic concentration of alkaline phosphatase International Federation of Clinical Chemist[J]. Clin Chem Lab Med, 2011, 49(9): 1439-1446.
[18] SIEKMANN L. Requirements for reference (calibration) laboratories in laboratory medicine[J]. Clin Biochem Rev, 2007, 28(4): 149-154.
[19] 汪静, 张传宝, 居漪, 等. 国际临床化学联合会酶学测定参考方法实验室网络的初步建立[J]. 中华检验医学杂志, 2008, 31(3): 258-263.
[20] 童清, 陈宝荣. 冰冻混合人血清酶校准品的赋值[J]. 临床检验杂志, 2015, 33(3): 226-229.
[21] TOUSSAINT B, CERIOTTI F, SCHIMMEL H, et al. Commutability study on candidate materials for three new enzyme certified reference materials[J]. Clin Chem Lab Med, 2014, 52: S1657.
[22] REJ R. Accurate enzyme activity measurements. Two decades of development in the commutability of enzyme quality control materials[J]. Arch Pathol Lab Med, 1993, 117(4): 352-364.
[23] PANTEGHINI M, CERIOTTI F. Obtaining reference intervals traceable to reference measurement systems: is it possible, who is responsible, what is the strategy? [J]. Clin Chem Lab Med, 2011, 50(5): 813-817.
[24] SCHUMANN G, KLAUKE R. New IFCC reference procedures for the determination of catalytic activity concentrations of five enzymes in serum: preliminary upper reference limits obtained in hospitalized subjects[J]. Clin Chim Acta, 2003, 327(1/2): 69-79.
[25] ICHIHARA K, CERIOTTI F, TAM T H, et al. The Asian project for collaborative derivation of reference intervals: (1) strategy and major results of standardized analytes[J]. Clin Chem Lab Med, 2013, 51(7): 1429-1442.
[26] HAN L Q, WANG J B, ZHANG Q X, et al. Development of reference intervals for serum alkaline phosphatase among adults in Southern China traced to the new IFCC reference measurement procedure[J]. Clin Chem Lab Med, 2016, 54(4): 659-665.
[27] HEIDUK M, PÄGE I, KLIEM C, et al. Pediatric reference intervals determined in ambulatory and hospitalized children and juveniles[J]. Clin Chim Acta, 2009, 406(1/2): 156-161.
[28] JANSEN R, SCHUMANN G, BAADENHUIJSEN H, et al. Trueness verification and traceability assessment of results from commercial systems for measurement of six enzyme activities in serum: an international study in the EC4 framework of the Calibration 2000 project[J]. Clin Chim Acta, 2006, 368(1/2): 160-167.
[29] JANSEN R, JASSAM N, THOMAS A, et al. A category 1 EQA scheme for comparison of laboratory performance and method performance: An international pilot study in the framework of the Calibration 2000 project[J]. Clin Chim Acta, 2014, 432(6): 90-98.
[30] GOOSSENS K, VAN UYTFANGHE K, THIENPONT L M. Trueness and comparability assessment of widely used assays for 5 common enzymes and 3 electrolytes[J]. Clin Chim Acta, 2015, 442: 44-45.
[31] 汪静, 曾洁, 闫颖, 等. 我国七个血清酶检验项目检测质量分析[J]. 中华检验医学杂志, 2015, 38(5): 313-317.
[32] INFUSINO I, FRUSCIANTE E, BRAGA F, et al. Progress and impact of enzyme measurement standardization[J]. Clin Chem Lab Med, 2017, 55(3): 334-340.
[33] BRAGA F, FRUSCIANTE E, INFUSINO I, et al. Evaluation of the trueness of serum alkaline phosphatase measurement in a group of Italian laboratories[J]. Clin Chem Lab Med, 2017, 55(3): 47-50.
[34] BRAGA F, INFUSINO I, PANTEGHINI M. Performance criteria for combined uncertainty budget in the implementation of metrological traceability[J]. Clin Chem Lab Med, 2015, 53(6): 905-912.
[35] COBBAERT C, WEYKAMP C, FRANCK P, et al. Systematic monitoring of standardization and harmonization status with commutable EQA-samples--five year experience from the Netherlands[J]. Clin Chim Acta, 2012, 414(1): 234-240.
[36] ZHANG C B, ZHAO H J, WANG J, et al. The application of six sigma techniques in the evaluation of enzyme measurement procedures in China[J]. Clin Lab, 2015, 61(5/6): 461-465.
[37] SANDBERG S, FRASER C G, HORVATH A R, et al. Defining analytical performance specifications: Consensus Statement from the 1st Strategic Conference of the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine[J]. Clin Chem Lab Med, 2015, 53(6): 833-835.
[38] 中华人民共和国卫生部. WS/T 403-2012 临床生物化学检验重要常规项目分析质量指标[S]. 北京: 人民卫生出版社, 2012.
[39] CAROBENE A, BRAGA F, RORAAS T, et al. A systematic review of data on biological variation for alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase and γ-glutamyl transferase[J]. Clin Chem Lab Med, 2013, 51(10): 1997-2007.
[40] CAROBENE A. Reliability of biological variation data available in an online database: need for improvement[J]. Clin Chem Lab Med, 2015, 53(6): 871-877.
[41] DATI F. The new European directive on in vitro diagnostics[J]. Clin Chem Lab Med, 2003, 41(10): 1289-1298.

（收稿日期：2017-12-15　修回日期：2018-02-18）