

· 临床研究 ·

肌氨酸氧化酶法和碱性苦味酸速率法检测血清肌酐结果比较和偏倚评估*

黄霞梅¹, 伍惠玲¹, 钟慧芝¹, 李海炜¹, 秦雪^{1△}, 李山²

(1. 广西医科大学第一附属医院临床医学实验部, 南宁 530021; 2. 广西医科大学医学检验系, 南宁 530021)

摘要:目的 比较肌氨酸氧化酶法和碱性苦味酸速率法测定血清肌酐的结果, 并探讨胆红素对两种测定方法的影响。方法 同时用两种方法检测非黄疸标本和黄疸标本, 对测定结果用 Excel2003 和 SPSS13.0 软件进行处理。结果 两种方法检测血清肌酐结果高度相关, 有很好的可比性($P < 0.05$), 但碱性苦味酸速率法的测定结果比肌氨酸氧化酶法高。两种方法测定肌酐结果有恒定偏倚, 且预期偏倚随肌酐浓度的降低而增大。用黄疸患者血清标本进行比较, 肌氨酸氧化酶法和碱性苦味酸速率法测定结果仍具有很好的相关性($P < 0.05$)。用粉剂总胆红素标准品作为干扰物发现胆红素对两种方法检测血清肌酐值均有正干扰, 而换 Beckman 总胆红素标准液则得出结果为两种方法均不受胆红素的影响。结论 两种方法检测非黄疸血清肌酐结果具有很好的可比性, 因其方法原理和仪器不同, 肌酐测定需建立不同参考值范围。

关键词:肌氨酸氧化酶; 碱性苦味酸速率法; 血清肌酐; 比对

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2011.33.020

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)33-3372-03

Comparison and bias analysis of enzymatic and jaffe kinetic methods for the serum creatinine determination*

Huang Xiamei¹, Wu Huiling¹, Zhong Huizhi¹, Li Haiwei¹, Qin Xue^{1△}, Li Shan²

(1. Department of Laboratory Medicine, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China; 2. The Faculty of Laboratory Medicine, Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China)

Abstract: Objective To compare the results of serum creatinine detected by both Enzymatic and Jaffe kinetic methods, and study the impact of jaundice serum on two determination methods. **Methods** Non-jaundice serum and jaundice serum were detected respectively by both Enzymatic assay and Jaffe kinetic assay with automatic biochemical analyzer Hitachi 7600 and Beckman Coulter LX20. The results were analyzed by SPSS13.0 and Excel2003. **Results** The results of the serum creatinine detected by the two methods were highly relevant and having commendable comparability($P < 0.05$), but the results of Jaffe kinetic assay were higher than those of Enzymatic assay. There were constant bias between Enzymatic assay and Jaffe kinetic assay for detecting serum creatinine, and the expected bias decreased with the increase of creatinine concentration. When use jaundice serum for experiment, the results of the serum creatinine detected by the two methods still were of good relevant. Interference experiment with powder bilirubin standards as interference substance in two methods presented that bilirubin had positive impact on creatinine determination. However, we found bilirubin had no interference in both methods when using Beckman's bilirubin standard as interference substance. **Conclusion** The two methods of detecting serum creatinine had good comparability. Ascribed to different methods and analyzers, reference range for creatinine should be established correspondingly.

Key words: sarcosine oxidase; jaffe kinetic assay; creatinine; method comparison

目前,我国临床实验室测定血清肌酐的方法主要有两类,一类是酶学测定法,另一类是碱性苦味酸速率法。由于这两类测定方法的原理不同,其结果可能不完全一致。为了对比广西医科大学第一附属医院临床医学实验部肌氨酸氧化酶法和碱性苦味酸速率法测定血清肌酐的结果,现根据美国国家临床实验室标准化协会(NCCLS)EP9-A2文件,对日立7600全自动生化分析仪的肌氨酸氧化酶法(简称酶法)和美国贝克曼LX20系统的碱性苦味酸速率法测定血清肌酐的结果进行平行对比和偏倚评估,同时还研究了胆红素对两种检测方法的影响。

1 材料与与方法

1.1 材料

1.1.1 样本来源 所有标本均来自广西医科大学第一附属医院的住院患者。新鲜非黄疸血清 80 份,无溶血、脂血、黄疸(酶法测定肌酐范围在 53~1602 $\mu\text{mol/L}$,不同浓度所占的比例参照参考文献[1]);黄疸血清标本 26 份,标本中总胆红素浓度为 30.5~390.5 $\mu\text{mol/L}$;混合血清由 18 份总胆红素和肌酐均正

常患者的血清标本混合而成。

1.1.2 仪器 美国贝克曼 coulter LX20-A 全自动生化分析仪和日立 7600 全自动生化分析仪。

1.1.3 试剂 酶法所用试剂为上海执诚生物技术有限公司提供,批号 DEC1015;校准品来自英国朗道股份有限公司, CAL1 (2530) 批号为 563UN, CAL2 (2531) 批号为 388UE;碱性苦味酸速率法所用试剂为原装贝克曼试剂(批号 112017),标准品为原装贝克曼标准品(批号 REF471291),质控品采用美国伯乐公司的低值(批号 14171)、高值质控品(批号 14172);总胆红素标准液为贝克曼 coulter LX20-A 配套使用标准液(胆红素改良 J-G 法专用),粉剂总胆红素标准品为日本制造,批号为 KL8901;肌酐检测参数的设置根据试剂厂商所提供的检测参数进行设置。

1.2 方法

1.2.1 血清肌酐的检测方法 酶法反应类型为两点终点法,波长为 700 nm(次)/546 nm(主)。碱性苦味酸速率法检测波

* 基因项目:广西卫生厅科研课题(z2008158)。△ 通讯作者, Tel:13977163919; E-mail:qinxue919@163.com。

表 1 样本测定值离群点的检验结果及控制限计算值

样本号	参比方法 X(酶法)($\mu\text{mol/L}$)				检验方法 Y(碱性苦味酸速率法)($\mu\text{mol/L}$)				E_{i1}	E_{i2}	E'_{i1}	E'_{i2}
	X1	X2	DX	DX'	Y1	Y2	DY	DY'				
1	148	152	4	0.027	164	168	4	0.024 1	16	16	0.11	0.11
2	317	320	3	0.009	339	345	6	0.017 5	22	25	0.07	0.08
3	90	92	2	0.022	97	100	3	0.030 5	7	8	0.08	0.09
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮
78	564	567	3	0.005	596	597	1	0.001 7	32	30	0.06	0.05
79	108	108	0	0	130	127	3	0.023 3	22	19	0.20	0.18
80	120	121	1	0.008	133	136	3	0.022 3	13	15	0.11	0.12
控制限			13.25	0.052			13.95	0.058 3			114.60	0.57

表中 DX、DX'、DY、DY'、 E_{i1} 、 E_{i2} 、 E'_{i1} 、 E'_{i2} 的解释见参考文献^[1]

长为 520 nm;以酶法作为参考方法(X),碱性苦味酸速率法作为比方法(Y)。每天用两种仪器对美国伯乐公司的低、高值质控品分别进行测定,保证仪器良好的质控状态,每次检测前均用校准品对肌酐进行校准,确保其检测的准确性。

1.2.2 比对试验 根据 NCCLS 的 EP9-A2 文件进行对比试验^[1],每天选取 16 份新鲜非黄疸血清标本分别在两台仪器上进行样品的双份测定,取其均值,连续测定 5 d,共计 80 对结果。样品的双份测定中指定第 1 份测定顺序,然后按反向顺序检测第 2 份标本,即 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16 和 16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1,顺序中的浓度随机排列。

1.2.3 干扰试验 (1)用患者黄疸血清标本作干扰试验,选择 26 份黄疸血清标本测定其肌酐浓度,其中黄疸血清标本中总胆红素浓度为 30.5~390.5 $\mu\text{mol/L}$ 。将标本分别用酶法和碱性苦味酸速率法进行双份测定,比较两种方法是否有差异。(2)选择总胆红素和肌酐均正常的住院患者血清 18 份并将其混合成为 1 份非黄疸混合血清,再分成 2 份,其中一份加入日本进口的粉剂胆红素标准品干扰物,按比例混合成 5 个不同干扰物浓度,总胆红素干扰物浓度范围为 36.8~323.9 $\mu\text{mol/L}$,另一份不加干扰物作为基础样品对照。具体方法参照 NCCLS 的 EP7-P 文件^[2]。每份标本重复测定 3 次,取平均值并计算分析各干扰组的干扰值。(3)用美国贝克曼配套胆红素标准液作为干扰物,将同体积蒸馏水和同体积不同浓度的干扰物分别加入上述等体积的非黄疸混合血清中,配成 5 个干扰物浓度即总胆红素浓度范围为 30.5~118.3 $\mu\text{mol/L}$ 。每个标本重复测定 3 次,取平均值并计算各干扰组的干扰值。

1.3 统计学处理 用 Excel2003 和 SPSS13.0 统计软件进行分析,数值用 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组资料均数比较进行配对 t 检验,并对两组数据进行相关和回归分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 比对试验结果

2.1.1 离群点检验 两种方法测定 80 份非黄疸血清样本中的肌酐浓度,对所得数据进行方法内和方法间重复测定值离群点的检验,未发现结果超出控制限,见表 1。说明双份测定值中均未出现离群点,可进行下一步的数据处理。

2.1.2 配对 t 检验及相关性分析 对非黄疸血清标本进行两种方法测定的比对试验,测定结果的均值进行配对 t 检验,差

异有统计学意义($t = -6.843, P = 0.000 1$)。对两组数据进行相关性分析和回归分析,得回归方程式为 $Y = 13.97 + 0.995X$ (X 为酶法, Y 为碱性苦味酸速率法),在测定非黄疸血清标本中的肌酐浓度时两种方法有很好的相关性($r = 0.998, P < 0.05$),见图 1。但是测定结果存在一定的差异,其中酶法测定结果的平均浓度为 296.85 $\mu\text{mol/L}$,碱性苦味酸速率法测定结果的平均值为 310.34 $\mu\text{mol/L}$,可见碱性苦味酸速率法的测定结果比酶法偏高。

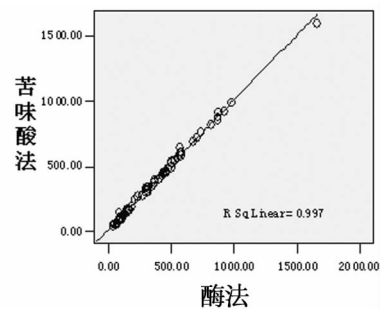


图 1 两种方法检测非黄疸血清结果的线性分析($\mu\text{mol/L}$)

2.1.3 偏倚估计 根据 NCCLS 中方法比对的要求,用低、中、高 3 个医学决定水平进行偏倚评估,按照公式:预期偏倚 = $13.97 + (0.995 - 1)X$ 、相对偏倚 = (预期偏倚/酶法测定值) $\times 100\%$ 计算出预期偏倚和相对偏倚,结果见表 2。

表 2 两种方法测定血清肌酐结果的预期偏倚和相对偏倚估计

酶法 ($\mu\text{mol/L}$)	碱性苦味酸速率法 ($\mu\text{mol/L}$)	预期偏倚 ($\mu\text{mol/L}$)	相对偏倚 (%)
100	113.47	13.47	13.47
400	411.97	11.97	2.99
700	710.47	10.47	1.49

2.2 干扰试验结果

2.2.1 黄疸患者血清标本的干扰试验 26 份黄疸血清标本分别用两种方法测定血清肌酐浓度,进行相关性分析和回归分析,得回归方程式为 $Y = 1.88 + 1.064X$ (X 为酶法, Y 为碱性苦味酸速率法),两种方法检测结果呈高度正相关($r = 0.993, P < 0.05$),结果具有可比性,两种方法受胆红素的影响是一致

的,见图 2。

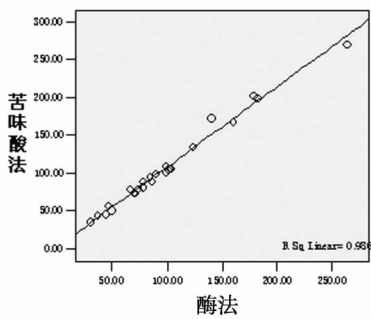


图 2 两种方法检测黄疸血清结果的线性分析($\mu\text{mol/L}$)

2.2.2 胆红素干扰试验 加入粉剂总胆红素标准品(钒酸氧化法试剂专用标准品)作为血清肌酐的干扰物,以干扰物浓度为横坐标,以干扰值为纵坐标作图,见插 II 图 3。结果显示两种方法检测的结果都显著升高,干扰值随着干扰物浓度的增加而增大,胆红素对肌酐的检测结果呈正干扰。更换总胆红素标准品,加入美国贝克曼 LX20 配套的总胆红素标准液(胆红素改良 J-G 法专用),肌酐测定值为纵坐标,干扰物浓度为横坐标,两种方法测定肌酐结果见插 II 图 4。结果显示碱性苦味酸速率法检测血清肌酐值在有干扰和无干扰的情况下进行比较,差异无统计学意义($P>0.05$);酶法检测血清肌酐值在有干扰和无干扰的情况下进行比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。根据对照样品 $\bar{X} \pm 1.96s$ 控制限判断,所得结果在设定的干扰物浓度范围内均无干扰。

3 讨论

酶法和碱性苦味酸速率法测定原理不同,导致测定结果产生差异,且在不同仪器上检测亦存在着仪器方面的系统误差。对于这两种方法检测肌酐之间差异的比较,国内已有报道,但所报道结果都不完全一致^[3-4]。本实验对这两种方法进行比较,探讨两种检测方法检测血清肌酐的可比性,发现两种方法检测结果高度相关,有很好的可比性,但苦味酸速率法的测定结果比酶法高。两种方法测定肌酐结果有恒定偏倚,且预期偏倚随肌酐浓度的降低而增大,即浓度为 $100 \mu\text{mol/L}$ 时,其相对偏倚为 13.47% ;而浓度为 $200 \mu\text{mol/L}$ 时,相对偏倚为 2.99% ;而浓度为 $700 \mu\text{mol/L}$ 时,则降为 1.49% ,此结果与居漪和曾芝如^[3]报道的结果一致,而与肖刚等^[4]报道的结果有一定的差异,差异出现可能与所用仪器和试剂不一致有关。传统的碱性苦味酸速率法检测肌酐的特异性不高,易受到维生素 C、葡萄糖、乙酰乙酸、丙酮酸、蛋白质等“假肌酐”的干扰^[5-6],且苦味酸试剂污染管道和比色杯不易清洗,易发生交叉污染^[7]。广西地区为肝炎高发区,黄疸患者较为常见,故本研究只针对胆红素对这两种检测方法的影响进行研究。作者采用的碱性苦味酸速率法为改良后的连续监测速率法,选用 $20 \sim 60 \text{ s}$ 为测定时间可有效地减少前 20 s 快速反应“假肌酐”物质的干扰和 60 s 后慢速反应“假肌酐”物质的干扰^[5]。本研究中干扰试验首先用黄疸患者血清标本进行比较,碱性苦味酸速率法和酶法测定结果仍具有很好的相关性,偏倚较小,说明两种检测方法受黄疸影响具有一致性。结合胆红素干扰实验,即先用粉剂总胆红素标准品作为干扰物加入混合血清检测肌酐,实验结果是两种方法均受胆红素干扰且胆红素干扰浓度越高,干扰值越大,这与相关文献报道不一致^[6-7]。于是进行重复试验,

结果也是胆红素对两种检测方法均有正干扰。之后换用贝克曼配套的总胆红素标准液作为干扰物再次进行干扰试验,结果发现两种方法均不受胆红素的干扰。分析其可能原因是与两种不同的胆红素标准品的制作成分来源不同有很大关系。且两种总胆红素标准品适用的方法不同,粉剂总胆红素标准品为钒酸氧化法试剂专用,而总胆红素标准液则适用于胆红素改良 J-G 法,这是否对此干扰试验造成影响还有待进一步研究。因总胆红素标准液的浓度仅为 $157.7 \mu\text{mol/L}$,再按比例配制得到的干扰物浓度较低,且检测物肌酐浓度亦被稀释至均值仅约为 $33 \mu\text{mol/L}$,造成干扰物浓度和检测物浓度的设置不合理,故本研究所得结论仍需进行大量工作去考证。鉴于碱性苦味酸速率法易受“假肌酐”物质的干扰和发生交叉污染,而与碱性苦味酸速率法相比,酶法测定血清肌酐的线性范围较宽,精密度和准确度均较高,且抗干扰能力强,交叉污染少^[6-8],很多医院都倾向于采用酶法检测血清肌酐,但酶法的经济成本也较高。

综上所述,只要检测仪器能保持良好的检测状态,检测参数的设置合理,规范检测操作,正确使用仪器和试剂,每天做好校准和质控工作,保证肌酐测定结果的准确性,则可将不同仪器不同方法的检测结果的可比性大大提高,故同一医院的实验室可同时适用酶法和碱性苦味酸速率法检测血清肌酐,但因方法原理不同,各方法间需建立参考值范围。总胆红素在本实验室的两种检测方法中是否存在干扰仍有待进一步研究,但需规范干扰物标准品的用法。

参考文献:

- [1] National Committee for Clinical Laboratory Standards. Method comparison and bias estimation using patient samples[R]. Villanova; NCCLS, 2002; EP9-A2.
- [2] National Committee for Clinical Laboratory Standards. Interference testing in clinical chemistry[R]. Villanova; NCCLS, 1992; EP7.
- [3] 居漪,曾芝如. 酶法和 Jaffe 速率法测定血清肌酐的方法学比较[J]. 上海医学检验杂志, 2002, 17(1): 24-25.
- [4] 肖刚,董杰明,朱远航. 肌氨酸氧化酶法和碱性苦味酸速率法测定血清肌酐的比较[J]. 实用医技杂志, 2006, 13(20): 3553-3555.
- [5] 叶应妩. 全国临床检验操作规程[M]. 3 版. 南京: 东南大学出版社, 2006: 466-467.
- [6] 石凌波,林龙顺. 常见肌酐测定方法中存在的干扰[J]. 中华检验医学杂志, 2001, 24(2): 102-104.
- [7] 顾国宝,陈洁,李燕. 全自动生化仪使用中项目间交叉污染的探讨[J]. 上海医学检验杂志, 2002, 17(3): 176-177.
- [8] 王卉妍. 胆红素对酶法和碱性苦味酸速率法测定肌酐的影响[J]. 医疗装备, 2009, 22(12): 39-40.

(收稿日期: 2011-06-09 修回日期: 2011-09-12)