

• 检验试剂评价

纳米微球增强免疫比浊法测定胱抑素 C^{*}

蒙 凯,王贤理,李俊英

(浙江伊利康生物技术有限公司,浙江温州 325011)

摘 要:**目的** 建立纳米微球增强免疫比浊测定血清胱抑素 C(Cys C)的全自动分析法。**方法** 用纳米微球增强免疫比浊测定 Cys C,并对方法进行精密度、线性、准确性等评价及临床初步应用探讨。**结果** 此方法批内 CV<40%,批间 CV<5.0%。抗干扰性强,4.0 g/L 血红蛋白、420 μmol/L 胆红素、2 200 IU/L 类风湿因子、10 mmol/L 三酰甘油对测定无影响;与进口试剂相关性良好($r=0.999\ 5$)。试剂开瓶稳定性良好。**结论** 纳米微球增强免疫比浊法测定血清 Cys C,具有方法简便、快速、灵敏的优点,且结果准确,可用自动分析仪测试,适合临床检验应用。

关键词:胱抑素 C; 肾小球滤过率; 纳米微球增强免疫比浊法
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.03.050 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2011)03-0389-02

血清胱抑素 C(cystatin C,Cys C),又名半胱氨酸蛋白酶抑制劑 C,含有 120 个氨基酸残基,以非糖基化的椭圆形小分子蛋白形式存在于所有的体液中,其中脑脊液中的浓度最高,尿中的浓度最低,是半胱氨酸蛋白酶抑制剂超家族成员之一。Cys C 由于相对分子质量较小,能够自由通过正常的肾小球滤过膜,可被近曲小管完全重吸收而降解。当肾功能减退时,血清 Cys C 有不同程度升高。通过测定血清 Cys C 能够很好地反映肾小球滤过率(glomerular filtration rate,GFR),是反映 GFR 较为理想的内源性标志物^[1-3]。本研究建立了纳米微球增强免疫比浊法测定血清 Cys C 浓度的方法,并对其检测性进行方法学评价。

1 资料与方法

1.1 一般资料 所有血清标本均采集自温州市第三人民医院门诊和住院患者。

1.2 试剂及仪器 试剂 1(R1)含甘氨酸缓冲液(25 mmol/L)、氯化钠(4.5 g/L)、聚乙二醇 20 000(3.0 g/L)、稳定剂和防腐剂;试剂 2(R2)含纳米微球共价结合的羊抗人 Cys C 8 mL、Cys C 标准液及低值、高值室内质控液(均来源于浙江伊利康生物技术有限公司)。干扰物质:600 μmol/L 胆红素标准液、5 g/L 血红蛋白溶液、2 200 IU/L 类风湿因子、10 mmol/L 三酰甘油。HITACHI 7180 全自动生化分析仪。

1.3 方法 主要分析参数:样本体积 15 μL,R1 体积 225 μL,R2 体积 50 μL,根据分析参数在仪器上编制检测程序,在 HITACHI 7180 全自动生化分析仪上完成检测。主波长 570 nm,副波长 800 nm,终点法。反应温度为 37℃,第 17 点读取 A1,第 34 点读取 A2,反应方向为上升反应。

1.4 统计学处理 采用 Stata10.0 软件进行统计学处理。

2 结 果

2.1 精密度 根据美国临床实验标准委员会(National Committee for Clinical Laboratory Standards,NCCLS)EP5-A2 文件对于精密度评价的要求,分别测定低值、中值和高值 3 种水平的 Cys C 浓度。2 h 内各水平连续测定 20 次,计算均值($\bar{x}$)、标

准差(s)、变异系数(CV)。每天测定 1 次,连续测定 20 d。批内和批间精密度结果见表 1。

表 1 批内和批间精密度结果

标本	批内			批间		
	$\bar{x}$ (mg/L)	s (mg/L)	CV(%)	$\bar{x}$ (mg/L)	s (mg/L)	CV(%)
低值	0.340	0.012	3.620	0.340	0.016	4.890
中值	2.550	0.051	2.000	2.550	0.058	2.290
高值	6.380	0.350	0.550	6.380	0.040	0.630

2.2 回收试验 取低值(0.11 mg/L)和高值(6.49 mg/L)新鲜血清样品各 1 份,以不同比例混合配制分析样品,然后分别测定 Cys C 的浓度,计算回收率(%),本法的平均回收率为 99.6%,见表 2。

表 2 回收试验结果

标本号	理论值(mg/L)	回收浓度(mg/L)	回收率(%)
1	0.65	0.66	102.2
2	1.63	1.64	101.5
3	2.72	2.70	99.2
4	3.89	3.85	98.9
5	4.13	4.08	98.7
6	5.34	5.21	97.5

2.3 对比试验 将血清样品($n=40$)同时用本法与日本进口原装 Cys C 试剂分别测定进行比较,测定范围为 0.05~7.61 mg/L,计算出回归方程为 $Y=1.007\ 5X+0.002\ 9$, $r=0.999\ 5$,经 t 检验得 $P>0.05$,表明 2 组结果差异无统计学意义,高度相关。

2.4 稳定性试验 包括 2~8℃ 开瓶上机稳定性、2~8℃ 放置稳定性、37℃ 加速热破坏试验,结果见表 3。

2.5 干扰试验 用稀释好的不同浓度的血红蛋白、胆红素和类风湿因子分别与含 Cys C 浓度较高的血清和生理盐水做回收试验,以回收率的高低判断是否存在干扰。4.0 g/L 的血红

* 基金项目:温州市龙湾区科技发展计划项目(2008S6Z)。

蛋白、420 $\mu\text{mol/L}$ 的胆红素和 2 200 IU/L 的类风湿因子、10 mmol/L 的三酰甘油不干扰 Cys C 测定。

表 3 稳定性试验结果 (mg/L)

时间(d)	2~8℃开瓶	2~8℃放置	37℃加热
0	1.33	1.33	1.33
5	1.34	1.32	1.28
10	1.32	1.31	1.24
20	1.30	1.29	1.21
30	1.29	1.30	1.08

2.6 灵敏度试验 将高浓度 Cys C 标准品分别稀释 0、1、10、20、40、80、160 倍后,测得 Cys C 浓度为 8.000、4.060、0.793、0.412、0.196、0.107、0.052 mg/L。

2.7 线性范围测定 按 NCCLS EP6P 文件作线性评价标准。取高浓度 Cys C 标准品 (8.12 mg/L) 和低浓度 Cys C 标准品 (0.06 mg/L),把 2 份样本等量混匀产生中间值标准品,再分别将中间值和低值、中间值和高值等量混匀,共产生 5 个不同浓度的标准品。在分析仪上用本试剂从低值到高值,然后从高值到低值对 5 个不同浓度的标准品分别平行测定 5 次,求得均值为 Y,以理论值为 X,经线性回归分析,得回归方程为:Y=0.990 5X+0.039 8, $r^2=0.999\ 9$,说明 Cys C 浓度在 0.06~8.00 g/L 时,本试剂检测线性良好。

3 讨 论

最初测定 Cys C 采用免疫电泳法,后发展为酶免疫法,这些方法准确性虽高,但操作复杂、费时,不适用于临床上的常规测定。目前常用的方法有 Kyhse-Andersen 等^[4]报道的颗粒增强透射免疫比浊法,此方法用兔抗人 Cys C 抗体包被羧基化修饰的肌酸颗粒,当颗粒与抗原结合时发生凝集反应而进行检测。此方法只需 6 min。用重组 Cys C 标准品作回收试验,回收率平均为 98%。受试者操作特征曲线证实,Cys C 诊断肾功能异常的灵敏度和特异性均高于血肌酐。Finney 等^[5]报道了一种能快速自动测定 Cys C 的颗粒散射比浊法,此方法原理与散射比浊法相似,但需要散射比浊仪,用人尿中纯化的 Cys C 标准品作回收试验,回收率平均为 102%。虽然这 2 种方法灵敏度差些,但检测下限 (150 $\mu\text{g/L}$) 远远低于健康人血清 Cys C 的下限,可满足临床应用,且均不受类风湿因子、胆红素、血红蛋白、三酰甘油的影响,而且可以像肌酐一样用于全自动化分

析仪^[6]。本组使用纳米微球增强免疫比浊法完成 Cys C 检测所涉及的仪器、试剂、校准品、操作程序、质量控制品的组合,称为检测系统^[7];将 HITACHI 7180 全自动生化仪、Cys C 纳米微球增强免疫比浊法试剂、配套标准品,组成一个新的检测 Cys C 的检测系统。为了评价该系统对 Cys C 的测定效果,本组对重复性试验、回收试验、干扰试验、灵敏度和线性范围进行了分析。

该法利用包被在纳米微球上的抗人 Cys C 抗体与 Cys C 抗原反应产生浊度,其浊度与 Cys C 浓度成正比。该法在 HITACHI 7180 全自动生化分析仪上有高度精密密度、良好准确度、较宽线性范围和较长开瓶稳定性,在抗干扰方面也有良好操作性能,可见本法完全符合临床检验使用的要求。

参考文献

[1] Michele M, Nicoletta R, Mariacristina V, et al. Quantitative automated particle-enhanced immunonephelometric assay for the routine measurement of human cystatin[J]. Clin Lab Med, 1998, 36 (11): 859-865.

[2] Tian S, Kusano E, Ohara T, et al. Cystatin C measurement and its practical use in patients with various renal diseases[J]. Clin Nephrol, 1997, 48(2): 104-108.

[3] 刘航. 胱蛋白酶抑制剂 C 与肾脏[J]. 中国实验诊断学, 2001, 5 (4): 152-153.

[4] 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.

[5] 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.

[6] 任爱英, 王凡. 血清胱抑素 C 的临床应用及研究[J]. 检验医学与临床, 2008, 5(1): 33-35.

[7] 冯仁丰. 临床检验质量管理技术基础[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2003: 5.

(收稿日期: 2010-02-03)

《国际检验医学杂志》编辑部成员及联系方式

编辑部主任: 刘志刚 023-63876382(办、传)E-mail: editorial2002@vip.sina.com

编辑: 陈开红 甘霖 023-63705045

张耀元 邓丽莉 王东 朱薇 罗瑞(实习编辑) 023-63616134

编务: 骆大伦 023-63616134编辑部邮箱: gwycxq@163.com

投稿网站: <http://gj.jourserv.com>国际检验医学网站: <http://www.gjyxcq.cn>