

• 论 著 •

乳酸脱氢酶参考方法起始液的比较研究

孙可其, 杨 涛, 吕 磊

(四川迈克生物科技股份有限公司, 成都 611731)

摘要:目的 研究乳酸脱氢酶参考测量程序溶液配制过程中起始液加 β -NAD 锂盐或氢氧化锂两种方法的性能差异。方法 用 RELA 2009 样本和有证参考物质对两种方法进行测量正确度验证;将两种起始液置于 37 °C 中水浴孵育,观察在指定时间点的测量结果,分析两者间可能存在的特性差异;参照 CLSI 的 EP9-A2 文件,对两种方法及迈克检测方法进行一系列相关性分析。结果 上述两种方法测定 RELA 2009 样本和有证参考物质的相对偏倚均小于 1.00%;37 °C 水浴条件下,加 β -NAD 锂盐的起始液随着孵育时间的延长,测定结果逐渐降低,而加氢氧化锂的起始液测定结果则与之相反;两种方法相关性分析结果为: $Y=0.997\ 4X-2.651\ 2(r^2=0.999\ 9)$ 。结论 乳酸脱氢酶参考测量程序溶液配制过程中起始液加 β -NAD 锂盐或氢氧化锂,两种方法性能不存在明显差异,同时也初步验证了迈克试剂量值溯源的有效性。

关键词:L-乳酸脱氢酶; 锂化合物; 参考方法; β -NAD 锂盐

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.07.022

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)07-0771-03

The comparative study on start reagent solution of lactate dehydrogenase reference method

Sun Keqi, Yang Tao, Lv Lei

(Reference System Department, Sichuan Maker Biotechnology Co., Ltd., Chengdu 611731, China)

Abstract:Objective To study the performance of two different methods in the process of preparing solutions with LDH reference measurement procedures, β -NAD lithium salt and lithium hydroxide was added into the start reagent solution, respectively. **Methods** The measurement accuracy of two different methods was verified with the samples of RELA 2009 and certified reference material. In addition, we incubated the two start reagent solutions in water bath at 37 °C and observed the measurement results at approved time points, and then evaluated possible differences of response characteristics. A series of correlation analyses between the two methods and MAKER method were carried out. **Results** Measurement bias of certified reference material and the samples of RELA 2009 with two above-mentioned measurement procedures were lower than 1.00%. Under the 37 °C condition, for the start reagent solution with β -NAD lithium salt, the measurement results decreased as the incubation time increased, while it is opposite for the start reagent solution with lithium hydroxide. The result of the correlation analysis of two methods was: $y=0.997\ 4x-2.651\ 2, r^2=0.999\ 9$. **Conclusion** In the preparation process of solutions with LDH reference measurement procedures, there is not significant difference in performance of the two methods that adding the β -NAD lithium salt or lithium hydroxide into the start reagent solution. At the same time, the effective traceability of MAKER assay kit is also initially verified.

Key words:L-lactate dehydrogenase; lithium compounds; reference method; β -NAD lithium salt

在现代临床生化检测中,酶催化活性浓度的检测是最频繁的检测项目之一,对于许多疾病,它是最有效的监测方法^[1-3]。但是,血清中酶催化活性浓度的结果是由测定的方法确定的,因此,要想取得测定结果的一致,主要是通过测定方法的标准途径来实现。为此,国际临床化学和检验医学联合会(IFCC)于2002~2006年陆续发表了37 °C条件下6种酶催化活性浓度的一级参考测量程序(PRMP)。在IFCC推荐的乳酸脱氢酶(LDH)参考测量程序起始试剂溶液配制时,如果只加 β -NAD游离酸,不用 β -NAD锂盐,那么最终反应完成后混合物的pH值会适当降低。本组通过一系列比较实验,进行初步的验证^[4-6]。

1 材料与方法

1.1 材料 LDH有证参考物质(ERM-AD453/IFCC)购于欧洲参考物质与测量研究所(IRMM),2009年国际参考实验室能力比对样本(RELA 2009 KSA, KSB),20例新鲜冰冻人血清样本(不同浓度)。

1.2 仪器与试剂 仪器包括紫外可见分光光度计(HITACHI U-3310,日本),全自动生化分析仪(HITACHI 7180,日本),稀释配液仪(Hamilton ML540B,瑞士),pH计(Orion 420A+, Thermo,美国),电子分析天平(LA 120 S, Sartorius, 德国),点

式温度计(Fluke 1521,美国)。试剂为N-甲基-D-葡萄糖胺(MERCK,德国),L(+)-乳酸锂盐、 β -烟酰胺腺嘌呤二核苷酸、氢氧化锂和 β -烟酰胺腺嘌呤二核苷酸锂盐(Sigma,美国),乳酸脱氢酶检测试剂盒(批号:0410131)和生化复合校准品(批号:0610091)均来自四川迈克生物科技股份有限公司。

1.3 方法 试剂配制按照IFCC推荐的《LDH参考测量程序》配制LDH反应溶液500 mL,起始溶液10 mL。配制另一种起始溶液10 mL,即将 β -NAD的游离酸0.763 g溶解于10 mL氢氧化锂溶液(78.78 mmol/L)。

1.4 统计学处理 采用Microsoft Office Excel 2003软件对实验数据进行统计和分析。

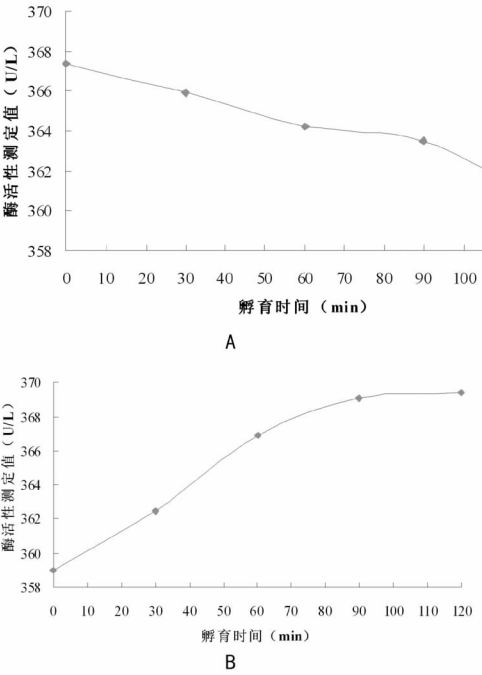
2 结果

2.1 两种方法检测的正确度验证结果 用两种起始液分别测定RELA 2009样本(以所有实验室的测定均值作为能力比对样本的靶值)和参考物质(证书的标示值为靶值),对测定的变异系数(CV)和测定均值与靶值的偏差进行统计分析。两种方法的测定变异系数均小于1.00%,测定结果与靶值的相对偏倚均小于1.00%,检测的正确度均较好,两种方法差异无统计学意义($P>0.05$),见表1。

表 1 两种方法的测量正确度验证结果

测定次数	起始液加 β-NAD 锂盐			起始液加 LiOH		
	KSA	KSB	ERM-AD453	KSA	KSB	ERM-AD453
1	365.48	176.52	502.49	364.85	173.81	501.99
2	364.92	176.02	502.63	365.65	176.01	501.30
3	364.85	175.38	501.85	367.00	176.37	502.22
均值(U/L)	365.08	175.97	502.32	365.83	175.40	501.84
CV(%)	0.09	0.32	0.08	0.28	0.79	0.10
相对偏倚(%)	-0.04	-0.48	0.06	0.17	-0.80	-0.03

2.2 两种起始溶液置于 37 ℃ 水浴孵育时的特性差异观察结果 本研究以 RELA 2009 KSA 样本作为质控物质来观察两种起始液的特性差异,37 ℃ 水浴条件下,加 β-NAD 锂盐的起始液随着孵育时间的延长,测定结果逐渐降低,而加氢氧化锂的起始液测定结果则与之相反,见图 1、2。



A:起始液加 β-MAD 锂盐;B:起始液加 LiOH。

图 1 两种起始液的特性差异观察结果

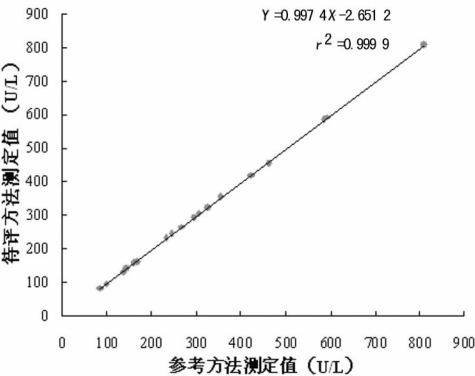


图 2 两种起始液临床样本测定结果相关性分析

2.3 方法学比较结果 本研究初步观察了两种方法学的相关

性。两种起始液测定临床样本相关性, $Y=0.997\ 4X-2.651\ 2$ ($r^2=0.999\ 9$),相关性良好。另外,本组同时也对 LDH 参考方法和迈克检测方法进行了方法学比较实验, $Y=0.992\ X-1.034\ 3$ ($r^2=0.999\ 8$),相关性良好^[7-8]。

3 讨 论

LDH 参考测量程序作为酶学一级参考测量程序中的典型代表,其试剂配制中起始液的试剂成分引起了一些实验室的关注,由于 β-NAD 锂盐对方法学的性能有较好的提高作用而被 IFCC 应用于参考方法中。此外,日本临床化学会(JSCC)推荐的方法中也含有 β-NAD 锂盐。但由于 β-NAD 锂盐的供应厂商较少、价格相当昂贵,且溶液配制时用量也较大,给一些实验室带来了一定的经济负担。因此,IFCC 酶学参考系统委员会推荐了另外一种可选择的配制方法:将 β-NAD 溶解于氢氧化锂溶液,这种方法也可以使起始液中 β-NAD 的游离酸和 β-NAD 锂盐的浓度达到参考方法的要求。

参考方法建立后,必须通过方法学的性能评价实验来验证它是否符合要求,而测量正确度是参考方法性能评价最重要的指标之一,LDH 有证参考物质的定值是采用 12 家参考实验室测定结果的未加权平均数,结果可溯源至酶学一级参考测量程序^[9]。而 RELA 2009 样本则来源于 IFCC 组织的 2009 年度参考实验室能力比对计划,样本的定值是采用参加 LDH 能力比对的全球 22 家参考实验室测定结果的未加权平均数。本研究通过重复测量酶有证参考物质和 RELA 2009 样本来验证两种方法的测量正确度。

由于酶学参考方法为手工方法,在加起始液时必须保证起始液的温度达到 37 ℃,但是,在 IFCC 推荐的参考方法中并没有明确规定通过何种方式将起始液的温度控制在 37 ℃,因此,本实验室在加起始液前将其置于 37 ℃ 水浴箱孵育一段时间,但是将起始液置于 37 ℃ 水浴箱孵育的时间过久可能会影响试剂的稳定性,从而影响测量的准确性。从本研究结果分析,两种起始液置于 37 ℃ 水浴箱孵育均会影响其测量的准确性,因此,本组在进行 LDH 参考测量时将起始液置于 37 ℃ 水浴箱孵育的时间应控制在 3~5 min,这样可以尽量减小影响。

酶学参考方法由于操作过程的特殊性,决定其很难完全按照 CLSI 的 EP9-A2 文件进行方法学比较实验,所以本研究根据实际情况对 EP9-A2 的评价方案和统计方式作了一些调整,因此,本研究也只能初步地观察两种方法的相关性。从比较分析结果来看,两者的相关性较好^[10]。

酶学一级参考测量程序作为酶学测量计量学上的最高标准,其最终的目的是将酶活性测量的准确性传递至常规医学实验室的检测结果。而应用于常规实验室的检测试剂往往出于稳定性和经济成本的考虑而无法完全采用参考方法的试剂配

方, LDH 常规检测试剂起始液一般加 β -NAD 的游离酸, 由此可能会影响方法学的特异性和量值溯源的有效性。就本研究结果而言, 虽然在 LDH 起始液中加氢氧化锂也能达到原始参考方法的效果, 但是在 LDH 起始液中加 β -NAD 锂盐或氢氧化锂其稳定性均不是十分理想, 可能都不宜用于常规检测试剂中^[11-13]。本研究通过方法学比较对 LDH 迈克检测方法和参考方法进行相关性分析, 对迈克 LDH 常规检测方法的特异性及其量值溯源的有效性进行了初步验证, 方法学比较的相关性系数为 0.999 9, 初步表明迈克 LDH 量值溯源有效。

参考文献

[1] 杨生宙, 李祥顺, 陈健, 等. 血清酶在新生儿缺氧缺血性脑病程度评判及治疗中的价值[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(7): 727.

[2] Siekmann L, Bonora R, Burtis CA, et al. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 °C, Part 1. The concept of reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes[J]. Clin Chem Lab Med, 2002, 40(6): 635-642.

[3] 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 2. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of creatine kinase[J]. Clin Chem Lab Med, 2002, 40(8): 631-634.

[4] 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.

[5] 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(9): 725-733.

(上接第 770 页)

3 讨 论

t-PA 及 PAI-1 活性的检测, 主要是观察各种疾病纤溶系统改变引起的血栓与止血异常的重要指标。两者之间的动态平衡对维持正常的血液流动有重要意义, 两者失衡将导致出血或血栓形成。t-PA、PAI-1 与恶性肿瘤活性变化, 临床和实验研究已证实了恶性肿瘤患者存在止血功能的异常^[3-4]。而纤溶系统在恶性肿瘤的发生、浸润和转移中所起的作用日益受到重视。

本组应用 STA-compact 全自动凝血仪底物发光技术, 对各种不同肿瘤患者的血液进行检测, 从而鉴别不同类型恶性肿瘤 t-PA 与 PAI-1 活性的变化。结果表明, 156 例不同类型恶性肿瘤患者 t-PA 与 PAI-1 活性明显高于健康对照组。进一步表明纤溶酶原激活剂和他们的抑制物失衡可能在肿瘤浸润、肿瘤细胞增殖和转移中起作用, 已经发现这些蛋白的一种或多种在一些恶性肿瘤患者中是无病间隔和长期生存的数字^[5]。而纤溶系统 t-PA 与 PAI-1 活性异常也是恶性肿瘤患者出血与血栓形成的主要原因。恶性肿瘤病理机制是多种原因形成的。

[6] 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 6. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of g-glutamyltransferase [J]. Clin Chem Lab Med, 2002, 40(8): 734-738.

[7] 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 a-amylase [J]. Clin Chem Lab Med, 2006, 44: 1146-1155.

[8] 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 3. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of lactate dehydrogenase [J]. Clin Chem Lab Med, 2002, 40(8): 643-648.

[9] 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 3. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of lactate dehydrogenase [J]. Clin Chem Lab Med, 2002, 40(6): 643-648.

[10] Gerhard S, Francesca C, Poul J, et al. IFCC reference procedures for measurement of the catalytic concentrations of enzymes; corrigendum, notes and useful advice[J]. Clin Chem Lab Med, 2010, 48(5): 615-621.

[11] 冯仁丰. 临床检验质量管理技术基础[M]. 上海: 上海科学技术文献出版社, 2007: 185-212.

[12] 王涛, 齐丽丽, 刘海燕, 等. 六种临床诊断酶学测定参考方法的应用及国际比对结果分析[J]. 中华检验医学杂志, 2008, 31(3): 264-269.

[13] 贾雄飞. 两种生化试剂测定 ALP 的方法对比及偏差评估[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(5): 1045.

(收稿日期: 2010-12-30)

t-PA 与 PAI-1 的检测是指从恶性肿瘤患者纤溶活性变化及肿瘤细胞转移和血栓形成造成患者病死原因进行研究。从而为临床诊断、治疗和预后观察提供依据。

参考文献

[1] 陈渝宁. 纤溶酶原激活剂与抑制剂的研究及临床意义[J]. 临床检验杂志, 1999, 53(3): 212-214.

[2] 闫海润, 金大伟, 仝连信, 等. 恶性胸腹水应用蛋白芯片肿瘤标志物检测的临床价值[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(7): 657-661.

[3] Tempelhoff GF, Heilmann L, Dietrich M, et al. Plasmatic plasminogen activator inhibitor activity in patients with primary breast cancer[J]. Thromb Haemost, 1997, 77(3): 606.

[4] Montemurro P, Conese M, Altomare DF, et al. Blood and tissue fibrinolytic profiles in patients with colorectal carcinoma[J]. Int J Clin Lab Res, 1995, 25(4): 195-200.

[5] 李家增. 恶性肿瘤与止血障碍[J]. 癌症进展, 2005, 3(2): 110-113.

(收稿日期: 2010-12-22)