

• 临床检验研究论著 •

天门冬氨酸氨基转移酶参考方法建立及性能评价*

迟 珊, 沈 默, 杨桂花, 张 曼[△]

(北京大学第九临床医学院临床检验中心, 北京 100038)

摘要:目的 建立测定血清天门冬氨酸氨基转移酶(AST)的参考方法,并对其进行主要分析性能进行评价。方法 按照国际临床化学与检验医学联合会(IFCC)颁布的AST一级参考测量程序(37℃)的要求建立参考方法,并根据美国临床实验室标准化委员会(NCCLS)系列文件(EP15-A、EP6-A)对建立的参考方法的精密度、线性范围等性能进行评价,通过测定有证参考物质(ERM)和参加国际参考实验室间比对活动(RELA)对准确度性能进行评价。结果 所有仪器性能均符合IFCC公布的关于AST的测定参考方法(37℃)的标准操作程序以及CNAS-CL33:《检测和校准实验室能力认可准则在临床酶学参考测量领域的应用说明》中对临床酶学参考实验室的主要设备的计量学性能要求;CV_{批内}<1%,CV_总<1%,符合参考方法精密度性能要求;ERM测定均值在其给定的参考值范围内,RELA测定结果在其给定的置信区间内,符合参考方法准确度性能要求;在AST参考方法所涉及的范围(16.05~361.88 U/L)呈线性,本实验室检测线性范围上限为361.88 U/L,高于IFCC公布的AST参考方法的最大线性范围(247.65 U/L)。结论 AST参考方法已基本建立,精密度、准确度及线性范围等性能指标均符合方法要求。可以提供给参考物质赋值等参考测量服务以及进行相关标准化研究。

关键词: 天门冬氨酸氨基转移酶类; 实验室技术和方法; 临床酶试验

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.08.010

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)08-0934-02

Establishment and evaluation of the reference methods of aspartate aminotransferase*

Chi Shan, Shen Mo, Yang Guihua, Zhang Man[△]

(Center of Clinical Laboratory, the Ninth Clinic Medical College of Peking University, Beijing 100038, China)

Abstract: **Objective** To establish the reference methods of aspartate aminotransferase(AST) and evaluate its analytic characteristic. **Methods** The reference method was established according to the primary reference procedure for the measurement of catalytic activity concentration of AST(37℃), which had been published by IFCC. Furthermore, the EP15-A and EP6-A protocols were used for evaluation of the precision and linearity range of the methods. ERM and RELA program were used for verification of the trueness. **Results** All the instruments were confirm to the demand of the primary reference procedure for the measurement of catalytic activity concentration of AST(37℃) and CNAS-CL33"Guidance on the Application of Testing and Calibration Laboratories Competence Accreditation Criteria in the Field of Clinical Enzymology Reference Measurement". The within-run and total precision were less than 1%. The results of ERM agreed with the certified value. The results of the RELA within the limits of equivalence provided by IFCC. They can verified the precision and accuracy of the reference method. The upper limits of the measurement ranges of AST were 361.88 U/L, which was higher than data published by IFCC(247.65 U/L). **Conclusion** The reference method has been established basically, which can be used widely for reference measurement service and correlative standardized research.

Key words: aspartate aminotransferases; laboratory techniques and procedures; clinical enzyme tests

天门冬氨酸氨基转移酶(AST)与丙氨酸氨基转移酶(ALT)是国内外应用最为广泛的反映肝细胞损害的指标且具有重要临床意义。为了提高酶学测定的精密度和准确度,以利于临床应用,开展酶学测定的标准化工作势在必行^[1-2]。本实验室自2006年开始,参与了国内首批酶学参考实验室的建立,研究者参照国际临床化学与检验医学联合会(IFCC)相关文件共建立了包括ALT、AST、γ-谷氨酰基转移酶(γ-GT)、肌酸激酶(CK)、乳酸脱氢酶(LDH)和淀粉酶(AMY)在内的共6个酶学项目的参考方法^[3-5]。本研究以AST为例进行参考方法的建立及进行性能评价,以期临床酶学标准化研究打下基础。

1 材料与与方法

1.1 一般资料 精密度样本:使用Roche的c.f.a.s用于精密度的测定,复溶前保存于4℃,复溶分装后冻存于-20℃,只允许冻融1次。准确度样本:有证参考物质(ERM),由欧共

体的参考物质与测量研究所(IRMM)制备,复溶前保存于-80℃。RELA样本,由IFCC提供,共有A、B两个浓度水平,为冻干粉末,测定前置于-80℃避光保存。线性范围评价样本:用无溶血、黄疸、脂血的新鲜患者血清作为线性范围评价样本。

1.2 仪器与试剂 美国Thermo公司提供的紫外分光光度计及其配套比色皿,美国Fluke公司提供的1521型点式温度计,瑞士METTLER TOLEDO公司提供的pH计以及瑞士HAMILTON公司提供的稀释配液仪等。所有试剂均由美国Sigma公司提供,纯度为分析纯,试剂原料完全依据IFCC公布的关于AST的测定参考方法(37℃)。

1.3 方法

1.3.1 AST参考方法的建立 仪器性能验证:本实验室所有仪器性能均完全符合IFCC公布的关于AST的测定参考方法

* 基金项目:首都医学发展科研基金资助项目(2011-2008-02)。
作者, E-mail: mzhang99@yahoo.cn。

作者简介:迟珊,女,检验技师,主要从事参考系统的研究。△ 通讯作

(37℃)的标准操作程序(SOP)^[6]以及CNAS-CL33《检测和校准实验室能力认可准则在临床酶学参考测量领域的应用说明》中对临床酶学参考实验室的主要设备的计量学性能要求。试剂配制:纯度为分析纯,配制方法完全依据IFCC公布的关于AST的测定参考方法(37℃)的SOP。

1.3.2 AST参考方法性能验证 精密度实验:参考美国临床实验室标准化委员会(NCCLS)EP15-A^[7]文件,选择c.f.a.s作为精密度实验样本。方法为连续测定c.f.a.s 5 d,每天重复测定3次。将测定结果进行统计,CV_{批内}和CV_总均应小于1%。准确度实验:ERM由欧共体参考物质与测量研究所(IRMM)制备,用于AST测定的ERM编号为ERM-AD457/IFCC。本实验共测定4次,计算测定值是否在给定的参考值范围内。国际参考实验室间比对计划(RELA):RELA是由国际临床化学与检验医学联合会(IFCC)和德国临床化学和实验室协会(DGKL)共同组织的全球参考实验室应用参考方法对参考物质进行测定的室间比对计划。该计划组织者共提供A、B两个水平的样本,参加比对的实验室的测定结果和不确定度范围在其给出的置信区间内表明此实验室的测定结果有效。本实验室每个水平样本测定4 d,每天测定8次,计算均值与不确定度,是否在其等效限内(±5.25%)。线性范围评价:参考NCCLS EP6-A文件^[8],选择覆盖IFCC文件提供的线性范围20%~30%的高(H)、低(L)浓度水平混合血清,按比例配制6个系列浓度样本(L、8L+2H、6L+4H、4L+6H、2L+8H、H),每个样本重复检测4次,将所得6个系列浓度样本测定结果进行多项式回归统计,得到方程式Y=bX+a。要求线性拟合方程相关系数r²≥0.999,且设定实验室的线性偏倚范围小于2%。

1.4 统计学处理 使用Microsoft Excel 2003对精密度、准确度以及线性范围评价进行统计学分析,主要统计指标有均值、标准差以及变异系数等。

2 结 果

2.1 精密度实验结果 AST精密度实验共测定c.f.a.s15次,测定均值为96.42 U/L,SD为0.86 U/L,CV_{批内}为0.85%,CV_总为0.89%,AST批内和总不精密度均小于1%。

2.2 准确度实验结果 有证参考物质测定结果:ERM定值方法是采用国际12个已认证参考实验室测定结果的未加权平均数,结果可溯源至IFCC原级参考方法。用于AST准确度测定的ERM标示值为(104.6±2.7)U/L。本实验室所有测定结果均在参考值范围内。RELA是全球参考实验室应用参考方法对参考物质进行测定的比对计划。此计划为酶学参考实验室能力验证的有效体现。本实验室在RELA 2009中,A、B两个水平样本的测定结果均在其给定的置信区间内,其相对偏倚均小于允许偏倚。AST参考方法的准确度评价结果见表1。

表 1 AST 参考方法的准确度评价

样本	测定次数	靶值 (U/L)	测定均值 (U/L)	偏倚 (U/L)	相对偏倚 (%)	允许偏倚 (%)
ERM	4	104.60	106.78	2.18	2.08	±2.58
RELA-A	32	97.26	96.66	-0.60	-0.62	±5.25
RELA-B	32	178.26	179.04	0.78	0.44	±5.25

2.3 线性范围评价结果 6个系列评价样本分别检测4次,测定均值分别为16.05、85.25、161.52、228.32、300.57、361.88 U/L。将测定结果进行多项式回归分析,结果拟合的二次多项

式系数b2和三次多项式模型系数b2和b3与0比较均无统计学差异,而一次多项式的b1与0比较有统计学差异,故判断检测系统呈线性(一次多项式),见表2。测定结果表明本实验室在参考方法所涉及的浓度范围内[(16.05~361.88)U/L]呈线性,本实验室检测线性范围上限为361.88 U/L,高于IFCC公布的AST参考方法的最大线性范围(247.65 U/L)。

表 2 拟合系数及拟合系数 P 值

系数	1 次拟合	2 次拟合	3 次拟合	1 次系数 P 值	2 次系数 P 值	3 次系数 P 值
b0	—	-61.173	-50.614	0.000	0.001	0.037
b1	69.769	76.704	63.421	0.000	0.000	0.031
b2	—	-0.991	3.409	—	0.057	0.452
b3	—	—	-0.419	—	—	0.242

—:无数据。

3 讨 论

在任何检测中,仪器设备的性能都是保证测量结果的精密度和准确度最关键的因素,在参考方法的运行中更是如此。本实验室具备可达到实施参考测量要求的全部设备,且所有性能指标均达到IFCC文件中的规定,并在参考方法的运行中保证所有仪器均经国家计量部门进行每年1次的校准并获得校准证书。对于使用频繁或不稳定的仪器设备,本实验室均在每次正式实验前进行内部校准,以保证仪器的准确性和稳定性。例如分光光度计在参考方法的运行中是关键设备,本实验室需定期对其噪声、基线平直度以及波长和吸光度的准确性等参数进行验证。又如天平为配制试剂中最重要的设备,其称量的准确性是保证试剂配制质量的重要前提,因此在每次称量前,均需用标准砝码对其进行内部校准。而移液设备在每次检测之前都要进行称量校准,所有用于加样的移液设备在校准后均需固定量程,以避免反复更改量程使移液设备的准确度下降。

参考方法完全采用手工操作,因此人员的经验及手法是保证测定结果精密准确的又一个关键环节。除了对移液器进行内部校准外,实验操作人员本身也要具有娴熟和精准的加样手法。本实验室所有技术人员之间比对的精密度均小于1%,这需要扎实的基本功和一定的实践经验的积累才能够达到。

在保证仪器设备和人员稳定的前提下,在参考方法初步建立以后,必须通过精密度、准确度和线性范围等性能评价来对参考方法进行验证。在精密度验证中,本实验室参照EP15-A文件进行精密度实验方法设计及结果统计,得到的精密度结果在设定目标范围内。

在确认检测系统精密度符合要求的基础上,才能进行准确度验证实验。参考方法准确度验证最主要的方法就是使用有证参考物质,其定值和不确定度可溯源至SI单位。用于AST测定的有证参考物质的基质为血清清蛋白,以冻干品形式分装在玻璃安瓿瓶中,并充入氮气。通过测定有证参考物可对酶学参考方法的准确度进行初步评价。在有证参考物的测定结果中,其测定均值位于相应的标示值及其不确定度范围内,说明AST参考方法的测定是符合准确度性能要求的。除此之外,RELA的结果是参考实验室能力的有效体现^[9]。本实验室自2006年至今已经连续7次参加此比对计划并均取得满意结果,以RELA 2009为例,本实验室RELA样本A、B值的测定均值与靶值的偏倚分别为-0.62%和0.44%,均远远小于其设定的允许偏倚(±5.25%),更进一步确证了本实验室的AST参考方法的准确度性能。(下转第940页)

临床要重视由呼吸道分离的铜绿假单胞菌的抗菌治疗。

从血标本和尿标本分离的铜绿假单胞菌和大肠埃希菌耐药性相差不大,只出现了几种药的耐药性有统计学差异。来自尿标本的铜绿假单胞菌对左氧氟沙星和环丙沙星的耐药率远高于血标本,而且差异有统计学意义($P<0.05$),这可能与在临床上喹诺酮类的抗菌药物是治疗泌尿系感染的常用药有关;但是对于大肠埃希菌,左氧氟沙星和环丙沙星的耐药性却没有差异,可能与大肠埃希菌喹诺酮类抗菌药物暴露机会多有关,左氧氟沙星和环丙沙星的耐药率均超过了 50%。从统计结果不难看出,引起尿路感染的铜绿假单胞菌和大肠埃希菌,亚胺培南的耐药率是最低的,这与国内李雷花等^[9]的研究结果是一致的。

从 ICU 痰标本分离的铜绿假单胞菌的耐药率均高于从呼吸内科痰标本分离的铜绿假单胞菌($P<0.01$)。铜绿假单胞菌具有多种天然和获得性耐药机制,耐药性强、耐药机制复杂,而且具有极强的环境适应能力;在 ICU 的患者,长期处于大量的抗菌药物包围下,细菌也渐渐出现各种耐药机制,有的甚至成了泛耐药菌;同时,由于使用多种导管、机械通气、人工吸痰等因素,使感染耐药菌的机会大大增加且多为克隆传播^[10],这使得 ICU 的院感控制工作显得尤为重要,尤其要注意从 ICU 转入其他科室的患者,防止交叉感染特别重要。虽然从呼吸内科和 ICU 痰标本分离的大肠埃希菌有 12 种抗菌药物的耐药率没有明显差异,但是在 ICU 的耐药率还是皆高于呼吸内科。这也提示了做细菌耐药统计时,最好把从 ICU 痰标本分离的细菌和其他分开来统计,这样更能合理反映实际的耐药水平,更好地指导临床医生经验用药,防止高级抗菌药物的过度使用,以此,延缓细菌耐药性的产生,延长高级抗菌药物的使用寿命。碳青霉烯类抗菌药物到目前为止,敏感率高依然是抗击重症感染的有力武器^[11];临床要重视耐药监测结果的动态变化,合理使用抗菌药物,保护好抗菌药物,让高级抗菌药物尽可能长时间发挥抗感染的作用。

(上接第 935 页)

线性范围验证也是反映参考方法性能评价的重要指标之一,它能判断对某一分析方法测得的浓度或活性值与设定的浓度或活性值之间的比例关系的范围。本研究显示本实验室自建 AST 参考方法的最大线性范围为 361.88 U/L,超过 IFCC 文件公布的 AST 参考方法最大线性范围(247.65 U/L)。

综上所述,本实验室在保证仪器、试剂、人员等主要因素质量的前提下,进一步对 AST 参考方法的主要分析性能进行验证并使其符合参考方法要求,AST 参考方法已基本建立。本实验室有能力保证参考测量结果的质量,可以提供给参考物质赋值等参考测量服务以及进行相关标准化研究。

参考文献

[1] 李恒,吕磊. 临床酶学标准化的研究[J]. 国际检验医学杂志, 2011,32(9):981-983.

[2] 郑松柏,庄俊华,张秀明. 临床酶学参考系统研究进展[J]. 临床检验杂志,2008,26(4):309-311.

[3] 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.

参考文献

[1] Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study[J]. Lancet Infect Dis, 2010, 10(9):597-602.

[2] 张玮博,倪语星. 铜绿假单胞菌耐碳青霉烯类抗菌药机制[J]. 微生物与感染, 2008, 3(2):107-123.

[3] Sun HY, Fujitani S, Quintiliani R, et al. Pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa*: part II: antimicrobial resistance, pharmacodynamic concepts, and antibiotic therapy[J]. Chest, 2011, 139(5): 1172-1185.

[4] Moore NM, Flaws ML. Epidemiology and pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* infections[J]. Clin Lab Sci, 2011, 24(1):43-46.

[5] 汪一萍,陈国忠,鲁勇,等. 多重耐药大肠埃希菌毒力基因研究[J]. 中华临床感染病杂志, 2012, 5(1):19-23.

[6] 张稀博,倪语星,孙景勇,等. 2010 年中国 CHINET 铜绿假单胞菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2012, 12(3):161-166.

[7] 王辉,陈民钧. 1994-2001 年中国重症监护病房非发酵糖细菌的耐药变迁[J]. 中华医学杂志, 2003, 83(5):385-390.

[8] 刘韶晖,许建成,刘铜军. 连续 5 年临床分离大肠埃希菌的耐药变迁[J]. 中国实验诊断学, 2010, 14(12):1980-1982.

[9] 李雷花,孙俊红,马青素. 尿路感染老年患者的病原菌分布及耐药分析[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(12):1450-1452.

[10] Harris AD, Johnson JK, Thom KA, et al. Risk factors for development of intestinal colonization with imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in the intensive care unit setting[J]. Infect Control Hosp Epidemiol, 2011, 32(7):719-722.

[11] 胡琴,聂署萍,吴润香,等. 耐碳青霉烯铜绿假单胞菌耐药表型及基因型分析[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(11):1305-1307.

(收稿日期:2012-11-09)

[4] 迟珊,沈默,张曼. γ -谷氨酰基转移酶国际室间比对计划结果分析[J]. 检验医学, 2011, 26(8):540-543.

[5] 迟珊,沈默,张曼. 参加肌酸激酶参考方法国际室间比对计划结果分析[J]. 中华检验医学杂志, 2010, 33(6):554-558.

[6] 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 5. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of aspartate aminotransferase [J]. Clin Chem Lab Med, 2002, 40(7):725-733.

[7] National Committee for Clinical Laboratory Standards. EP15-A User demonstration of performance for precision and accuracy; approved guideline[S]. Wayne, PA: NCCLS, 2001.

[8] Clinical and Laboratory Standards Institute. EP6-A Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures a statistical approach, approved guideline[S]. Wayne, PA: NCCLS, 2003.

[9] 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.

(收稿日期:2012-11-09)