

• 质控与标规 •

## 血清肌酐候选参考方法的建立及常规检测系统正确性评价

袁国忠<sup>1</sup>, 沈敏<sup>2</sup>, 吴立山<sup>2</sup>, 周冬梅<sup>2</sup>

(1. 吉安市永新县人民医院, 江西吉安 343400; 2. 宁波美康生物科技股份有限公司, 浙江宁波 315104)

**摘要:**目的 建立血清肌酐(Cr)候选参考方法,并评价其性能,通过方法学比较来评价常规检测系统的正确性,实现常规系统的溯源性。方法 建立肌氨酸氧化酶法作为血清肌酐(Cr)测定的候选参考方法,通过参加国际参考实验室室内质量评价活动(IFCC-RELA)验证该方法的准确性和可靠性;采用候选参考方法和常规检测系统(以下简称常规方法)同时测量 20 份不同浓度的新鲜血清和校准品,按 EP 文件评价常规方法的正确性和校准品的互通性。结果 肌酐标准曲线线性方程为:  $Y = 0.0008842X - 0.0003253$  ( $r^2 = 0.9999$ ), 线性范围 50~2000  $\mu\text{mol/L}$ ; 测量血清样本的相对标准偏差小于 1.0%; 测量 IFCC-RELA 样本,结果在等效范围内。常规检测系统与候选参考方法回归方程的斜率为 1.0056,且校准品落在候选参考方法和常规方法回归方程的  $\pm 95\%$  置信区间内。结论 成功建立了血清肌酐候选参考方法,可用于评价常规检测系统的正确性和校准品的互通性,为血清肌酐常规检测系统向参考方法或参考物质溯源提供有效途径。

**关键词:**血清肌酐; 候选参考方法; 常规方法; 正确性评价

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.08.046

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)08-1043-02

Development of a candidate reference method for the determination of serum creatinine and application for accuracy assessment of conventional detection systems

Yuan Guozhong<sup>1</sup>, Shen Min<sup>2</sup>, Wu Lishan<sup>2</sup>, Zhou Dongmei<sup>2</sup>

(1. Ji'an City People's Hospital of Yongxin County, Ji'an, Jiangxi 343400, China;

2. Ningbo Medical System Biotechnology Co., Ltd, Ningbo, Zhejiang 315104, China)

**Abstract: Objective** To develop a candidate reference method for the determination of serum creatinine and to evaluate the accuracy of conventional detection systems through method comparison to achieve traceability. **Methods** The candidate reference method was established according to the sarcosine oxidase and the accuracy and reliability of the method was verified through participation in international reference laboratories EQA activities (IFCC-RELA). 20 fresh single human serum samples with different concentration and calibrator were simultaneously measured by using conventional detection system and candidate reference method. **Results** The calibration curve for serum creatinine was linear in the concentration range from 50–2000  $\mu\text{mol/L}$  with a correlation coefficient of 0.9999 under the optimum experimental conditions (the linear equation was  $Y = 0.0008842X - 0.0003253$ ) and the imprecision was less than 1.0%. The proposed method has been applied to the determination of RELA samples with satisfactory results. The measured results with conventional detection systems were consistent with candidate reference method, and the slope of the regression equation was 1.0056. **Conclusion** The candidate reference method of serum creatinine is successfully established and which can be used for traceability and standardization. It may provide an effective way for conventional detection system traceable to the reference method or reference material.

**Key words:** serum creatinine; candidate reference method; conventional detection system; accuracy assessment

血清肌酐(Cr)测定是临床中常用的检测项目,也是急诊肾功能检测项目之一。血清肌酐值是评价肾小球滤过率及诊断急性、慢性肾衰竭的有效指标。目前,国际医学检验溯源联合委员会(JCTLM)公布的血清肌酐参考方法主要是同位素稀释-质谱法(包括 ID-GC-MS 和 ID-LC-MS),该方法属于决定性方法,具有较高的准确性和灵敏度,但运行成本昂贵,一般实验室难以完成。常规方法主要有碱性苦味酸法和酶法<sup>[1]</sup>,此类方法操作简单,成本较低,已在临床实验室广泛应用。但这些方法都存在或多或少的基体效应,造成不同常规方法间检测结果差异较大,缺乏可比性。以往研究表明,校准品是否具有互通性和赋值是否准确是影响常规方法检测结果正确性的重要因素。因此,采用参考方法和常规方法进行方法学比较对校准品赋值,是实现临床检验标准化的有效途径。

本研究建立肌氨酸氧化酶法作为血清肌酐(Cr)测定的候选参考方法,通过参加国际参考实验室室内质量评价活动(IFCC-RELA)验证该方法的准确性和可靠性;采用候选参考方法

和常规方法同时测量 20 份不同浓度的新鲜血清和校准品,按 EP 文件评价常规方法的正确性和校准品的互通性。以期实现常规检测系统的溯源性。

### 1 材料与方法

**1.1 仪器** 参考方法: Cary 100 紫外可见分光光度计(Agilent, 美国), 1524 型点温计(FLUKE, 美国), XS205DU 型分析天平(Mettler Toledo, 瑞士), 移液器(Eppendorf AG, 德国), 容量瓶(Asone, 日本)。所用仪器均通过相关部门鉴定或参照参考实验室内部文件校准。常规方法:日立 7180 全自动生化分析仪(Hitachi, 日本)。

**1.2 试剂** 参考方法:肌酐(SRM914a)购自美国国家标准与技术研究院(NIST), 磷酸二氢钠( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )、磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )、TOPS(C12H18N8NaO3S)、4-AAP(C5H5N5)等均购自 Sigma 公司, 抗坏血酸氧化酶、肌酸脲基水解酶、肌氨酸氧化酶、过氧化物酶、肌酐酰胺基水解酶、胆红素氧化酶等均购自瑞士罗氏公司, 国际参考实验室室内比对样本(两个浓度水平:

RELA-A 和 RELA-B) 由 IFCC 提供。实验室用水为超纯水。常规方法: 宁波美康生物科技股份有限公司肌酐试剂盒(酶法, 批号: 130528) 及配套校准品(批号: 120721)。配套校准品定值  $177 \mu\text{mol/L}$

### 1.3 方法

**1.3.1 试剂的配制** 依据美康生物科技股份有限公司参考实验室内部标准配制所需的试剂, 包括磷酸缓冲液、反应试剂、空白试剂、启动试剂等。

**1.3.2 肌酐标准溶液的配制** 准确称取  $45.25 \text{ mg}$  肌酐标准物质溶于  $5 \text{ mmol/L}$  盐酸溶液中, 待其完全溶解后转移至  $200 \text{ mL}$  容量瓶中。平衡容量瓶和  $5 \text{ mmol/L}$  盐酸溶液至  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ , 加  $5 \text{ mmol/L}$  盐酸溶液至刻度线。贮存于密闭的试剂瓶中, 溶液于  $2\sim 8 \text{ }^\circ\text{C}$  稳定 1 个月。工作标准液: 采用梯度稀释法配制浓度为  $50, 100, 200, 500, 1\ 000, 2\ 000 \mu\text{mol/L}$  的标准工作液。

**1.4 测定程序** 样本测定步骤见表 1(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。

**1.5 结果计算** 样本测试前按 1.4 程序测定肌酐工作标准液, 可得到肌酐浓度和校正吸光度  $Y(\text{A}_{\text{test}} - \text{A}_{\text{blank}})$  的工作曲线  $Y = a + bX$  ( $a$  为截距,  $b$  为标准曲线的斜率), 将待测样本的校正吸光度  $A$  代入上述工作曲线中即可得到待测样本中肌酐的浓度。

**1.6 方法学比较** 按 EP9-A2 和 EP14-A2 文件, 采用已通过 IFCC-RELA 能力验证的候选参考方法和常规方法同时测定 20 份不同浓度的新鲜人血清样本和校准品, 以候选参考方法为横坐标, 以常规方法为纵坐标作图。根据回归方程的斜率来判断常规方法的准确性以及校准品在厂家配套常规分析系统中与临床血清样本的互通性。

## 2 结果

### 2.1 血清肌酐候选参考方法的性能评价

**2.1.1 线性** 根据 1.4 方法测定工作标准液, 以理论浓度为横坐标, 校正吸光度为纵坐标作图, 见图 1(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”), 标准曲线的线性方程  $Y = 0.000\ 884\ 17X - 0.000\ 325\ 34$  ( $r^2 = 0.999\ 9$ )。表明该方法测定肌酐样本浓度从  $50\sim 2\ 000 \mu\text{mol/L}$  都呈良好的线性关系。

**2.1.2 精密度** 取 5 份不同梯度的新鲜血清, 平行测定 9 次, 结果表明 5 份血清的相对标准偏差均小于  $1.0\%$ , 说明该方法测定血清样本具有良好的精密度。

**2.1.3 准确度** 采用上述方法测定 2011 年和 2012 年 RELA 样本, 连续测定 2 d, 每天测定 5 次。结果见表 2(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。IFCC-RELA 是由国际临床化学联合会(IFCC)主办、德国临床化学和实验医学协会(DGKL)承办的全球最具权威的参考实验室能力验证。本实验室建立的参考方法测定 RELA 样本结果均在 IFCC-RELA 规定的等效限内, 表明该方法已通过 IFCC-RELA 能力验证, 且与决定性方法如同位素稀释/液相色谱/质谱联用(ID/LC/MS)具有很好的相关性。见表 2(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。

**2.2 候选参考方法与常规方法测量结果比较** 采用已通过 IFCC-RELA 能力验证的候选参考方法和和常规方法同时测定 20 份不同浓度的新鲜人血清样本, 以候选参考方法为横坐标, 以常规方法为纵坐标作图。结果如图 2 所示(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”), 从图中可以看出, 两者具有很好的相关性( $r^2 = 0.999\ 8$ ), 且线性方程的斜率为  $1.005\ 6$ , 说明常规方法与候选参考方法测量结果具有良好的一致性。

**2.3 校准品的互通性评价** 根据 EP14-A2 文件, 采用已通过 IFCC-RELA 能力验证的候选参考方法和常规方法同时测定 20 份不同浓度的新鲜人血清样本和校准品(校准品作为样本穿插于血清样本进行测定), 以候选参考方法为横坐标, 以常规方法为纵坐标作图。结果如图 3 所示(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”), 从图中可以看出, 校准品落在候选参考方法和常规方法的回归方程的  $\pm 95\%$  置信区间内, 表明校准品具有良好的互通性。

## 3 讨论

本研究建立的血清肌酐候选参考方法基于肌酐酸氧化酶法<sup>[2]</sup>, 采用紫外可见分光光度计测定。其反应原理是: 肌酐在肌酐酶的催化下水解生成肌酸, 肌酸酶催化肌酸水解产生尿素和肌氨酸, 肌氨酸在肌氨酸氧化酶的作用下氧化生成甘氨酸、甲醛和  $\text{H}_2\text{O}_2$ 。最后在过氧化酶的作用下发生偶联 Trinder 反应生成红色的醌亚胺,  $546 \text{ nm}$  下显色, 吸光度上升的程度与样本中肌酐浓度成正比。反应方程式见图 4(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。

相关研究表明, 肌氨酸氧化酶法中的 Trinder 反应(EQ. 4)易于受到基质中维生素 C 和胆红素的干扰<sup>[3]</sup>。基于此, 在本研究中加入抗坏血酸氧化酶消除维生素 C 的干扰, 加入胆红素氧化酶消除胆红素的干扰。为了验证该方法的准确性, 作者进行了 IFCC-RELA 验证, 检测结果令人满意并与决定性方法具有很好的相关性。因此, 该方法具有准确性好、线性范围宽、抗干扰能力强等优点。

为了验证常规方法测量结果的正确性, 按 EP9-A2 文件评价其与候选参考方法测量结果的一致性。结果发现常规方法与候选参考方法测量准确性一致, 说明常规方法对校准品赋值是正确的, 具有溯源性。

量值溯源中的另一个重要问题是校准物的互通性<sup>[4]</sup>。校准物(参考物质)必须对于两个有关测量程序具有互通性, 即用两程序测量此校准物所得结果的数字关系, 与用这两个程序测量实际样品所得结果的数字关系一致。其评价方法可以通过 EP14-A2 文件来评估, 校准品落在候选参考方法和常规方法回归方程的  $\pm 95\%$  置信区间内, 表明校准品具有良好的互通性。

综上所述, 本文基于肌氨酸氧化酶法建立的血清肌酐候选参考方法, 方法性能符合要求, 测量结果通过 IFCC-RELA 能力验证。该方法可用于评价常规检测系统的正确性和校准品的互通性, 为血清肌酐常规检测系统向参考方法或参考物质溯源提供有效途径。

## 参考文献

- [1] Lindbäck B, Bergman A. A new commercial method for the enzymatic determination of creatinine in serum and urine evaluated: comparison with a kinetic Jaffé method and isotope dilution-mass spectrometry[J]. Clin Chem, 1989, 35(5): 835-837.
- [2] Fossati P, Prencipe L, Berti G. Enzymic creatinine assay: a new colorimetric method based on Hydrogen peroxide measurement [J]. Clin Chem, 1983, 29(8): 1494-1496.
- [3] 程海平, 廖璞. 血清中肌酐的检测方法及其进展[J]. 检验医学与临床, 2009, 6(19): 1682-1684.
- [4] 陈宝荣, 孙慧颖, 邵燕, 等. IFCC 参考方法对两种测量系统 GGT 结果正确性的验证[J]. 标记免疫分析与临床, 2011, 18(5): 336-341.