

• 论 著 •

血清肌钙蛋白 I 质控物的研究*

施英娟¹, 王建新^{1,2△}, 王超¹, 施秀英^{1,2}, 王惠民^{1,2}

(1. 南通大学附属医院检验科, 江苏南通 226001; 2. 南通大学公共卫生学院检验系, 江苏南通 226006)

摘要:目的 评价自制血清肌钙蛋白 I(cTnI)质控物均匀性和稳定性。方法 按实验设计收集混合血清, 分装-20℃贮存。参照 CNAS-GL03《能力验证样品均匀性和稳定性评价指南》, 对质控物的均匀性进行评价; 运用恒温加速试验研究稳定性。结果 质控物均匀性差异无统计学意义($P>0.05$)。恒温加速试验显示, 血清 cTnI 降解随时间变化符合化学动力学一级反应, 根据 Arrhenius 方程推测 4℃贮存 7 d, -20℃贮存有效期为 19 个月; 监测质控物 9 个月, 与恒温加速试验结果一致。结论 自制血清 cTnI 质控物均匀性、稳定性良好, 可用于临床室内质量控制。

关键词:血清肌钙蛋白; 质控物; 均匀性; 稳定性

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.14.005

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)14-1969-02

The study of serum cardiac troponin I control materials*

Si Yingjuan¹, Wang Jianxin^{1,2△}, Wang Chao¹, Si Xiuying^{1,2}, Wang Huimin^{1,2}

(1. Department of Laboratory Medicine, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong, Jiangsu 226001, China;

2. School of Public Health, Nantong University, Nantong, Jiangsu 226006, China)

Abstract: **Objective** To prepare a set of serum cardiac troponin I quality control materials for testing and evaluate the homogeneity and stability. **Methods** Mixed serum were collected, filtered, distributed, stored at -20℃ according to the experimental design. The homogeneity of serum pools was evaluating according to the CNAS-GL03 Guidance. The stability of cTnI in human serum was examined using an accelerated stability testing protocol according to the Arrhenius equation. Further, the effect of stability was verified by long term test. **Results** In the homogeneity evaluation the results showed that there were insignificant difference between the control materials ($P>0.05$). Stability analysis, the control should not exceed 2 times by freeze-thawing; constant temperature accelerated test results showed that the serum levels of cTnI degraded in accordance with the change of chemical first-order reaction kinetics. Arrhenius-plots indicated that the cTnI control materials were stable for at least 7 days at 4℃ and 19 months at -20℃, respectively. Control materials were monitored for 9 months, the results are stable, and consistent with the constant temperature acceleration. **Conclusion** The homogeneity and stability of serum cTnI is good and can be used in clinical quality control.

Key words: serum cTnI; control; stability; homogeneity

cTnI 作为检测心肌损伤最敏感的生物学指标, 广泛应用于临床诊断、风险分层与疗效观察等方面, 其检测结果历来受到重视。本世纪初, 国外许多学者关注 cTnI 标准化工作^[1]。2006 年, 美国临床化学协会(AACC)cTnI 标准化委员会研究 cTnI 的参考品。同年, 从天然人心脏提取的 cTnI 复合物被美国国家标准与技术研究院批准为 cTnI 标准物质(SRM2921)^[2-3]。国内学者用基因重组方法表达具有天然活性的 cTnI 质控品, 与 SRM2921 具有一致的免疫反应性^[4]。近年研究发现 SRM2921 标准品存在基质效应, 与人源血清 cTnI 缺乏互通性^[5-6]。因此, 人源血清 cTnI 标准品和质控物成为研究热点。本研究制备人源血清 cTnI 质控物, 对其均一性、稳定性进行评价。

1 材料与方法

1.1 一般材料 收集 2013 年 11 月 AMI 住院患者血清, 作为 cTnI 添加血清, 收集健康人血清作为 cTnI 质控物稀释血清。上述血清均无溶血、黄疸、乳糜, 乙型肝炎病毒感染血清标志物(两对半)、丙型肝炎病毒抗体(HCV)、人类免疫缺陷病毒抗体(HIV)、梅毒抗体及类风湿因子(RF)均阴性。根据实验计将其调整至预期浓度水平, 制备 1、2 号质控物, 分装前充分搅匀, 0.5 mL/每支, -20℃保存。

1.2 仪器与试剂 仪器为美国强生 VITROS 5600 全自动生

化免疫分析仪。试剂与校准品由美国强生公司, 批号为 1481。质控品购自美国伯乐公司, 高值批号 23552, 低值批号 23551。

1.3 方法

1.3.1 均匀性检验 参照 CNAS-GL03《能力验证样品均匀性和稳定性评价指南》均匀性评价要求, 每批随机抽取 10 支质控物, 每支测量 2 次评价均匀性^[7]。

1.3.2 恒温加速稳定性实验 研究方案选择 2 号质控物, 在 25、37、45℃恒温水浴箱孵育一定时间, 上机检测。将不同温度下的热加速稳定性数据按公式 $\ln C = \ln C_0 - kt$ 计算, 式中的 C 为测量值, C_0 为初始测量值, k 为降解速率常数, t 为时间。将不同温度下的加速稳定性数据拟合线性回归方程, 求出不同温度下的 k 值, 拟合线性回归方程。不同温度的降解速率常数 k 与温度的动力学关系符合 Arrhenius 方程^[8]: $\ln k = -E/T + \ln A$, T 为绝对温度, R 为摩尔常数, E 为活化能, A 为初始测量值。拟合线性回归方程, 推算低温贮存的稳定性, 即计算 4℃、-20℃质控物降解至目标值所需时间。

1.3.3 长期稳定性验证 将-20℃贮存的样品分别于 3、6、9 月取样测量, 将结果与 0 个月比较, 验证恒温加速稳定性。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 分析软件进行单因素方差分析。

2 结果

* 基金项目:南通大学自然科学基金项目(13Z018)。 作者简介:施英娟,女,主管技师,主要从事免疫学诊断及质量管理研究。 △ 通讯作者, E-mail:wwbft@126.com。

2.1 均匀性检验结果 自制 1 号质控物测量结果(0.122 ± 0.003) $\mu\text{g/L}$, CV 为 2.62%, 单因素方差分析 $P=0.79$; 2 号质控物测量结果(4.533 ± 0.084) $\mu\text{g/L}$, CV 为 1.85%, $P=0.15$ 。样本均匀性符合要求, 差异均无统计学意义($P>0.05$)。

2.2 恒温加速试验结果 将 25、37、45 $^{\circ}\text{C}$ 、降解速率常数 k 按公式拟合出线性回归方程 $Y=-5.6697/T+15.52$, 见图 1。据此推测 4 $^{\circ}\text{C}$ 贮存有效期为 7 d, -20 $^{\circ}\text{C}$ 下贮存有效期 19 个月。

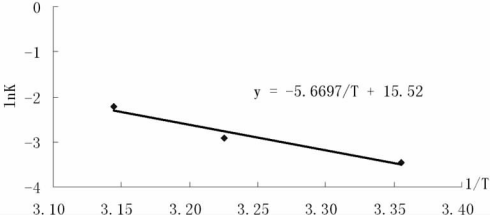


图 1 根据 k 值拟合线性回归方程

2.3 长期稳定性验证 将 -20 $^{\circ}\text{C}$ 贮存的质控物分别于 3、6、9 月检测并与 0 个月比较, 差异无统计学意义($P>0.05$)。质控物的百分偏差均在 $\pm 10\%$ 以内, 小于 cTnI 生物学变异的质量规范最低标准(10%)^[9]。监测质控物 9 个月, 与恒温加速试验结果一致。

3 讨 论

国内外学者在 cTnI 标准化和质控物研究方面做了大量的探索, 起初认为天然人人心脏 cTnI 复合物可作为 cTnI 一级参考物质。近年发现 SRM2921 样品存在基质效应, 可能与从心肌组织中提取 cTnI 或重组纯化过程中蛋白质发生修饰有关。血液 cTnI 的主要存在形式是 cTnI-cTnC 复合物, 优于重组蛋白及心肌提取物。美国临床化学学会标准化组织用血清混合液及单一患者标本评价候选参考物质, 发现不同检测系统结果更为一致, 表明基质效应可忽略^[5]。

实验室制备控制物应重视生物安全及避免内源性物质干扰被检测成分。本研究 cTnI 质控血清来源实验室体检者及患者检测后剩余血清, 为保证混合血清质控物不存在感染因素, 选择乙型肝炎病毒感染标志物、HCV、HIV 及梅毒抗体阴性血清。为避免内源性物质干扰, 收集血清均无溶血、黄疸、乳糜。此外, 选择 RF 阴性标本, 避免 RF 阳性物质的干扰^[10]。本研究自制 cTnI 控制物为液体, -20 $^{\circ}\text{C}$ 贮存, 复融后外观清澈, 无絮状颗粒, 均匀性良好, 符合 CNAS-GL03 文件要求。恒温加速试验结果显示, 血清 cTnI 的降解随时间变化符合化学动力学一级反应。以 cTnI 生物学变异的质量规范最低标准 10% 为依据。推测样品 4 $^{\circ}\text{C}$ 稳定期为 7 d, 厂商声明 4 $^{\circ}\text{C}$ 稳定 1 周, 结果一致; -20 $^{\circ}\text{C}$ 下贮存稳定期 19 个月, 目前, 实验室长期稳定性监测 9 个月, 质控物稳定。本研究发现不同检测系统稳定性不完全相同, 其差异可能与 cTnI 独特的生物学特性及不同

表位 cTnI 的降解速度不同有关^[11]。Kenis 等^[12]研究 IL-6、IL-6 受体、IL-10 及 CC16 细胞因子的稳定性报道相似情况。此外, 血清 cTnI 含量的变化受到环境温度、湿度、血清中其他成分等因素的影响, 预测结果和实际测量结果之间可能存在偏差。因此, 恒温加速稳定性试验预测样品稳定性只能作为参考依据, 不能完全取代长期稳定性试验。

IFCC WG-TNI 工作组正研究 cTnI 的参考方法和参考物质, 目的使不同 cTnI 检测系统结果尽量一致。本结果为研究血清 cTnI 参考物质和质控物提供参考。

参考文献

[1] Christenson RH, Duh SH, Apple FS, et al. Standardization of cardiac troponin I assays: round Robin of ten candidate reference materials[J]. Clin Chem, 2001, 47(3): 431-437.

[2] Christenson RH, Duh SH, Apple FS, et al. Toward standardization of cardiac troponin I measurements part II: assessing commutability of candidate reference materials and harmonization of cardiac troponin I assays[J]. Clin Chem, 2006, 52(9): 1685-1692.

[3] Bunk DM, Welch MJ. Characterization of a new certified reference material for human cardiac troponin I[J]. Clin Chem, 2006, 52(2): 212-219.

[4] 才蕾, 武建伟, 邓秋. 人心肌钙蛋白 I 冻干质控品的制备及评价[J]临床检验杂志, 2014, 32(8): 615-617.

[5] Tate JR, Bunk DM, Christenson RH, et al. Standardisation of cardiac troponin I measurement: past and present[J]. Pathology, 2010, 42(5): 402-408.

[6] Zhang S, Zeng J, Zhang C, et al. Commutability of possible external quality assessment materials for cardiac troponin measurement[J]. PLoS One, 2014, 9(7): e102046.

[7] 中国合格评定委员会. CNAS-GL03《能力验证样品均匀性和稳定性评价指南》[S]. 2006.

[8] Peleg M, Norrmand MD, cooradini MG, et al. The arrhenius equation revisited[J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2012, 52(9): 830-851.

[9] 杨雪, 张传宝, 王薇, 等. 我国心肌损伤标志物不同检测系统质量水平调查[J]. 临床检验杂志, 2013, 33(1): 65-67.

[10] 周涛, 王晓云, 杨红. 类风湿性关节炎类风湿因子对检测 cTnI 的影响研究[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(11): 1130.

[11] Guy MJ, Chen YC, Clinton L, et al. The impact of antibody selection on the detection of cardiac troponin I[J]. Clin Chim Acta, 2013, 4(1): 82-88.

[12] Kenis G, Teunissen C, De Jongh R, et al. Stability of interleukin6, Soluble interleukin 6 receptor, interleukin 10 and CC16 in human serum[J]. Cytokine, 2002, 9(2): 228-235.

(收稿日期: 2015-03-12)

(上接第 1968 页)

[7] 韦柳华, 周定, 程红革, 等. 综合医院金黄色葡萄球菌的耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2012, 8(22): 1712-1713.

[8] 李璐, 陈金云, 范国萍. 2009-2011 年浙江省富阳市人民医院金黄色葡萄球菌的感染分布和耐药性调查[J]. 疾病监测, 2013, 28(12): 992-995.

[9] 齐子芳, 李恩杰, 田立华. 临床分离金黄色葡萄球菌的耐药性分析[J]. 临床输血与检验, 2011, 13(1): 30-33.

[10] 王立新, 胡伟明, 胡志东, 等. 2006~2011 年 60 株血感染金黄色

葡萄球菌毒素及耐药基因分析[J]. 天津医药, 2013, 41(4): 334-336.

[11] Saderi H, Emadi B, Owlia R. Phenotypic and genotypic study of macrolide, lincosamide and streptogramin B (MLSB) resistance in clinical isolates of Staphylococcus aureus in Tehran, Iran[J]. Med Sci Monit, 2011, 17(2): 48-53.

(收稿日期: 2015-02-28)