

乳胶增强免疫比浊法测定血清胱抑素 C

于德军¹, 蒙 凯² (1. 黑龙江省大庆市第二医院检验科 163461; 2. 浙江伊利康生物技术研发中心 325011)

【摘要】 目的 建立乳胶增强免疫比浊测定血清胱抑素 C(Cystatin C)的全自动分析方法。**方法** 采用乳胶增强免疫比浊法测定 Cystatin C, 根据美国临床实验室标准化协会相关文件, 对方法进行精密度、线性、准确性等评价及临床初步应用。**结果** 此方法批内 CV<4.0%, 批间 CV<5.0%。抗干扰性强, 血红蛋白小于或等于 4.0 g/L、胆红素小于或等于 420 μmol/L、类风湿因子小于或等于 2 200 U/L、三酰甘油小于或等于 10 mmol/L 对测定无影响; 与进口试剂相比, $Y=1.007\ 5X+0.002\ 9$, $r=0.999\ 5$, 二者相关性良好。试剂开瓶稳定性良好。**结论** 乳胶增强免疫比浊法测定血清 Cystatin 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】 乳胶增强免疫比浊法; 胱抑素 C; 肾小球滤过率

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2011.10.004 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2011)10-1159-02

The detection of serum cystatin C by latex-enhanced immunoturbidimetry YU De-jun¹, MENG Kai² (1. Department of Clinical Laboratory, Second Hospital of Daqing City, Daqing, Heilongjiang 163461, China; 2. Yilikang Biotechnology Research and Technology Centre, 325011, China)

【Abstract】 Objective To establish a new automatic method of latex-enhanced immunoturbidimetry for the detection of serum cystatin C. **Methods** According to relevant documents of NCCLS, the precision, linearity and accuracy of this method were evaluated by latex-enhanced immunoturbidimetry. **Results** The intra and inter coefficient variations(CV) of this method were less than 4.0% and 5.0% respectively, and the performance of anti-interference was strong. when the level of hemoglobin was above 4.0 g/L, the level of bilirubin was $\leq 420\ \mu\text{mol/L}$, the level of rheumatoid factor was $\leq 2\ 200\ \text{U/L}$, the level of triglyceride was $\leq 10\ \text{mmol/L}$, there was no influence of the test result. A comparison between imported cystatin C(Y) and this kit(X) showed the following results: $Y=1.007\ 5X+0.002\ 9$, $r=0.999\ 5$. There was a good correlation between the two reagents. According to the statistical data, the reagents would be stable after first use. **Conclusion** The detection of serum cystatin C by latex-enhanced immunoturbidimetry is convenient, fast, accurate and suitable for automation analysis, which can be applied to the clinical implication.

【Key words】 latex-enhanced immunoturbidimetry; cystatin C; glomerular filtration

血清胱抑素 C(Cystatin C)又名半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C, 含有 120 个氨基酸残基, 是一种非糖基化的椭圆形小分子蛋白。Cystatin C 存在于所有的体液中, 其中脑脊液中的浓度最高, 尿液中的浓度最低, 是半胱氨酸蛋白酶抑制剂超家族成员之一。Cystatin 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, 可在近曲小管完全被重吸收而降解。当肾功能减退时, 血清 Cystatin C 有不同程度升高。大量实验表明, 通过测定血清 Cystatin C 能够很好地反映肾小球滤过率(GFR), 是 GFR 较为理想的内源性标志物^[1-3]。因此, 血清 Cystatin C 浓度的测定对于临床上发现早期肾损害和肾功能改变具有重要意义。本研究建立了乳胶增强免疫比浊测定血清 Cystatin C 浓度的方法, 并对其检测性能进行方法学评价。

1 资料与方法

1.1 一般资料 样品均为本院门诊和住院患者。

1.2 试剂与仪器 试剂 1(R1): 甘氨酸缓冲液 25 mmol/L、氯化钠 4.5 g/L、聚乙二醇 20000 3.0 g/L、稳定剂和防腐剂适量; 试剂 2(R2): 含乳胶共价结合的羊抗人 Cystatin C 8 mL、Cystatin C 标准液及低、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。HITACHI 7180 全自动生化分析仪。

1.3 方法

1.3.1 检测原理 将含有 Cystatin C 样本与共价结合在乳胶上的 Cystatin C 抗体在缓冲液中结合, 形成稳定的抗原-抗体复合物, 并产生一定的浊度, 通过测定一定时间后吸光度变化值, 与同样条件下校准液相比较, 即可计算出样本中 Cystatin C 的浓度。

1.3.2 主要分析参数 样本体积 15 μL, R1 体积 225 μL, R2 体积 50 μL, 主波长 570 nm, 副波长 800 nm, 采用终点法。反应温度为 37 ℃, 第 17 点读取 A1, 第 34 读取 A2, 反应方向为上升反应。

1.3.3 操作方法 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。

1.4 统计学方法 采用 STATA10.0 软件进行统计学处理。

2 结果

2.1 精密度 根据美国临床实验室标准化协会(NCCLS) EP5-A2 文件对于精密度评价的要求^[4], 分别测定低、中和高值 3 种水平的 Cystatin C 浓度。2 h 内各水平连续测定 20 次, 计算 $\bar{x}$ 、s、批内 CV。每天测定 1 次, 连续测定 20 d, 计算 $\bar{x}$ 、s、日间 CV。批内精密度和日间精密度结果见表 1。

2.2 回收试验 取低值和高值新鲜血清样品各 1 份(0.11、

6.49 mg/L),以不同比例混合,成为分析样品,然后分别测定 Cystatin C 的浓度,计算回收率,结果见表 2。

表 1 批内和日间精密度结果(mg/L)

样本号	标本	批内			日间		
		$\bar{x}$	<i>s</i>	CV(%)	$\bar{x}$	<i>s</i>	CV(%)
1	低值	0.34	0.012	3.62	0.34	0.016	4.89
2	中值	2.55	0.051	2.00	2.55	0.058	2.29
3	高值	6.38	0.350	0.55	6.38	0.040	0.63

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

注: * 血清 Cystatin C 的平均回收率为 99.6%。

2.3 对比试验 将血清样品(*n* = 40)同时用乳胶增强免疫比浊法与日本进口原装 Cystatin C 试剂分别测定并进行比较,测定范围为 0.05~7.61 mg/L,计算出回归方程为 $Y = 1.007\ 5X + 0.002\ 9$ (*X* 为日本进口原装 Cystatin C 试剂),相关系数(*r*) = 0.999 5,经 *t* 检验两组结果差异无统计学意义(*P* > 0.05),高度相关。

2.4 稳定性试验 将本法试剂按以下几种方式测试:(1)2~8℃开瓶上机稳定性,即第一次校准后开瓶置于仪器冷藏,随后不再校准,每天监控相同批次标本,直到失控为止;(2)2~8℃开瓶第 1 次校准后,随后不再校准,每天监控相同批次标本,直到失控为止,但每天测定结束后及时密闭瓶盖;(3)加速热破坏试验。37℃热破坏性试验,每次测定前进行重新校准,每天监控相同批次标本,直到失控为止。从试验结果可看出,本法试剂显示出良好的开瓶稳定性(至少 1 个月以上)。结果见表 3。

表 3 稳定性试验结果(mg/L)

时间(d)	2~8℃开	2~8℃闭	37℃
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

注:“开”指始终开瓶上机观察;“闭”指开瓶上机,测定结束后密闭;“37℃”指热破坏性试验。

2.5 干扰因素 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 Cystatin C 浓度较高的血清和生理盐水做回收试验,以回收率的好坏判断是否存在干扰,结果见表 2。各干扰因素在一定浓度范围内对 Cystatin C 无干扰,结果见表 4。

2.6 灵敏度试验 用乳胶增强免疫比浊法 Cystatin C 试剂对系列稀释标准品进行浓度测定,Cystatin C 标准品稀释 0、1、

10、20、40、80、160 倍的 Cystatin C 标准品测定结果分别是:8.0、4.06、0.793、0.412、0.196、0.107、0.051 6 mg/L。

表 4 回收试验结果

干扰物	加入量	测定值(mg/L)	理论值(mg/L)	回收率(%)
类风湿因子(U/L)	0	3.67	—	—
	172	3.54	3.50	101
	860	2.35	2.29	102
	2 200	1.94	1.88	103
胆红素(μmol/L)	0	3.11	—	—
	120.0	2.76	2.72	101
	160.0	2.35	2.37	99
	420.0	2.00	2.00	100
三酰甘油(mmol/L)	0	0	5.47	—
	4.0	4.03	4.15	97
	6.0	2.83	2.88	98
	10.0	1.54	1.58	97
Hb(g/L)	0	4.00	—	—
	1.0	3.25	3.31	98
	2.0	2.56	2.60	98
	4.0	1.91	1.92	99

注:—表示无数据。

2.7 线性范围测定 按 NCCLS(EP6P)文件做线性评价标准,取一高浓度 Cystatin C 标准品(8.12 mg/L)和一低浓度 Cystatin C 标准品(0.06 mg/L),然后把 2 份样本等量混匀产生中间值,再分别将中间值和低、中和高值等量混匀,共产生 5 个不同浓度的样品。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 个不同浓度的标本分别平行测定 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: $Y = 0.990\ 5X + 0.039\ 8$, $r^2 = 0.999\ 9$,说明本试剂 Cystatin C 浓度在 8.0 g/L 范围内线性良好。

3 讨 论

最初测定血清 Cystatin C 的方法是采用免疫电泳法,后发展为酶免疫法,这些方法准确性虽高,但操作复杂,费时,不适于临床上的常规测定。目前常用的方法有 Kyhse-Andersen 等^[5]报道的用一种颗粒增强透射免疫比浊法,此方法用兔抗人的 Cystatin 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 Cystatin C 标准品进行回收试验,回收率平均为 98%。ROC 曲线证实,Cystatin C 诊断肾功能异常的灵敏度和特异性均高于血肌酐。Finney 等^[6]报道的一种能快速自动测定 Cystatin 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,用人尿液中纯化的 Cystatin C 标准品进行回收试验,回收率平均为 102%。虽然这两种方法灵敏度差些,但检测限(150 μg/L)远远小于健康人血清 Cystatin 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^[7]。张鹏和汪萍^[8]报道肾脏损伤的患者尿液 Cystatin C 的水平与健康对照组相比,差异有统计学意义。(下转第 1163 页)

节,抑制成纤维细胞增殖和分泌基质等作用而降低肺动脉压^[11]。

低分子肝素钙与血浆蛋白结合少,不易于内皮细胞结合,清除较快,故生物利用度高,且与血管假性血友病因子亲和力低,引起出血的不良反小^[12]。皮下给药的生物利用度几乎达 100%,引起出血的发生率低,无需监测凝血酶原时间,在应用低分子肝素钙治疗前 5~7 d 无需监测血小板数量,使用方便^[13]。本实验研究结果显示,在常规治疗基础上,加用低分子肝素钙和复方丹参滴丸联合治疗肺心病右心衰竭,高黏滞血症得到显著改善,红细胞比容降低。在临床方面如咳嗽、咳痰、喘息及右心衰竭临床症状亦明显改善,由此提示两种药物具有协同增效作用,且联用后不良反应轻微,患者耐受性较好,提示低分子肝素钙联合复方丹参滴丸治疗肺心病安全、有效,值得临床推广应用。

参考文献

- [1] National cor pulmonale group. Diabnostic criteria of chronic cor pulmonale[J]. Shanxi Med J, 1982, 11(1): 35-39.
- [2] Guo X, Weng Y, Xie C, et al. Condition of cor pulmonale prethrombotic state and curative effect analysis of anticoagulant therapy[J]. Chin J Prac Inter Med, 2002, 22(8): 479-480.
- [3] Wang C, Du M, Cao D, et al. Pathological study on formation of pulmonary arterioles clots in chronic cor pulmonale acute stage[J]. Nat Med J China, 1997, 77(2): 123-125.
- [4] Romano PM, Peterson S. The management of cor pulmonale[J]. Heart Dis, 2000, 2(6): 431-437.
- [5] Huang L, Dong R. Correlation between coagulation function of cor pulmonale and pulmonary function medical when intervening with low molecular heparin[J]. Chin J Hemorheol, 2005, 15(1): 83-85.
- [6] Cai B. Respiratory Inter al Medicine[M]. Beijing: Peking

Union Medical College Press, 2002: 403.

- [7] Stammer F, Diehm C. Low molecular weight heparin in atherothrombotic cardiovascular diseases. Value in coronary disease, ischemic stroke and peripheral arterial occlusive disease[J]. Dtsch Med Wochenschr, 1999, 124(25-26): 802-809.
- [8] Liu Y. Effect analysis on heparin treating cor pulmonale complicated with respiratory failure[J]. Chin J Misdiagnosis, 2008, 8(4): 794-795.
- [9] Zhou S, Shao W, Duan C, et al. Clinical observation of administration of compound salvia injection in preventing and treating myocardial ischemia on CHD undergoing non-cardiac surgery[J]. Chin J Integrated Traditional West Med, 1999, 12(2): 75-76.
- [10] Zhang Y, Zhao B, Li Y, et al. Clinical study on treatment of CHD with compound danshen dripping pills in combination with astragalus injection[J]. Chin J Integrated Traditional West Med, 2000, 20(5): 378-379.
- [11] Quan H, Liu X, Quan D, et al. Change of ST-T on compound danshen dripping pills treating CHD in 50 patients[J]. Chin J Integrated Traditional West Med, 2000, 20(12): 943-944.
- [12] Verstraete M. Pharmacotherapeutic aspects of unfractionated and low molecular weight heparins[J]. Drugs, 1990, 40(4): 498-530.
- [13] Respiratory medicine branch association of china. Diagnosis and treatment guidelines of Pulmonary thromboembolism[J]. Chin J Tuberculosis Respir Dis, 2001, 24(5): 259-264.

(收稿日期: 2010-12-27)

(上接第 1160 页)

本文将 HITACHI 7180 全自动生化仪、Cystatin C 乳胶增强免疫比浊法试剂及配套标准品组成一个新的检测 Cystatin C 的检测系统。为了评价该系统对 Cystatin C 的测定效果,本文对重复性试验、回收试验、干扰试验、灵敏度和线性范围进行了分析。分析结果显示,该法是利用包被在乳胶上的抗人 Cystatin C 抗体与 Cystatin C 抗原反应产生浊度,其浊度与 Cystatin C 浓度成正比。该法在 HITACHI 7180 全自动生化分析仪上有高度的精密度和良好的准确度,较宽的线性范围和较长的开瓶稳定性,在抗干扰方面也有良好的操作性能,可见本法完全可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 routinary measurement of human cystatin C. [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] NCCLS. Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods; Approved Guideline-Second Edition. NCCLS document EP5-A2 [J]. NCCLS, Wayne Pennsylvania USA, 2002: 20-23.
- [5] 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.
- [6] 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 ID) [J]. Clin Chem, 1997, 43(6): 1016-1022.
- [7] 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.
- [8] 张鹏, 汪萍. 尿 Cystatin C 对评估肾小管损伤程度的应用价值[J]. 检验医学教育, 2009, 16(4): 43-46.

(收稿日期: 2010-12-17)