

葡萄糖氧化酶双试剂终点法测量模式的系统分析

高小文,孔花娟,李 筱,李雄海,柏 莹,陈文华(陕西省汉中市中心医院检验科 723000)

【摘要】 目的 通过系统地评价葡萄糖氧化酶双试剂终点法不同参数设置,寻求终点法最佳参数设置模式。**方法** 比较葡萄糖氧化酶终点法 5 种模式对 4 个不同浓度样品的分析结果,评价不同参数限制所起作用的实际表现。**结果** 终点法 5 种模式中模式 1(有效的线性和吸光度限制)能够对不同浓度样品进行准确地分析测量,并能对高值标本的底物耗尽现象进行有效地识别判断,其余 4 种模式均存在一些缺陷。**结论** 葡萄糖氧化酶双试剂终点法在岛津 CL-8000 全自动生化分析仪上应用时要重视参数模式的正确选择和运用,尤其是终点吸光度 A 值的最高检测限额要设置在 1300~1400 mAbs,线性范围设置在 24.5 mmol/L 左右,才能与实际情况相符。

【关键词】 葡萄糖氧化酶法; 双试剂终点法; 参数设置

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2014.01.022 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2014)01-0049-03

Systematic analysis of glucose oxidase double reagent endpoint measurement mode GAO Xiao-wen, KONG Hua-juan, LI Xiao, LI Xiong-hai, BAI Ying, CHEN Wen-hua (Department of Clinical Laboratory, Hanzhong Municipal Central Hospital, Hanzhong, Shaanxi 723000, China)

【Abstract】 Objective To find out the optimal parameter setting mode by analyzing the different parameter settings of glucose oxidase double reagent endpoint method. **Methods** To compare the analytical results of 5 modes of glucose oxidase double reagent endpoint method on 4 different concentrations of samples for evaluating the real performance of effect of different parameter limits. **Results** Among 5 modes, the first mode (effective linearity and absorbance limit) could accurately analyze and measure the different concentrations of sample, effectively identify and judge the the sample substrate depletion phenomenon of the high value samples. Some defects existed in the other 4 modes. **Conclusion** Should pay attention to the correct choice and use of the parameter modes of glucose oxidase double reagent endpoint method by using the Shimadzu CL-8000 fully automatic biochemical analyzer. Especially the highest detection limit of endpoint absorbance A value should be set at 1300-1400 mAbs, the linear range should be set at 24.5 mmol/L, which could conform to the real situation.

【Key words】 glucose oxidase method; double reagent endpoint method; parameter setting

目前血清葡萄糖临床实验室测定有 3 种方法^[1]: 己糖激酶法、葡萄糖氧化酶法和葡萄糖氧电极法。另外还有床带式血糖仪^[2], 在临床科室血糖监控中普遍应用。己糖激酶法是葡萄糖测定的参考方法^[3], 但成本较高, 临床实验室实际应用较少。葡萄糖氧电极法是近年来应用于临床的快速检测方法, 自动化程度高, 结果快速, 需要特殊电极, 成本较高, 适用于急诊项目, 是未来血糖检测发展的方向, 但实际应用不多。葡萄糖氧化酶法特异性不高, 但在临床广泛应用于各诊断实验室, 血清葡萄糖氧化酶法在终点法中具有鲜明的特点, 能充分体现终点法全自动生化分析不同测量模式下的表现形式。然而各试剂供应商给各级医院提供的不同型号的全自动生化分析仪参数, 普遍存在一些不合理的地方, 加之设备厂家工程师对不同型号仪器参数设置也认识不够, 导致仪器的某些参数设置形同虚设, 起不到应有的作用, 给临床个别标本的分析带来很大的误差, 目前这一问题报道较少^[4]。本文以参数设置具有合理性和代表性的岛津 CL-8000 全自动生化分析仪为例, 系统地分析了血清葡萄糖氧化酶双试剂终点法各种参数设置模式的优缺点, 供临床实验室人员参考。

1 材料与与方法

1.1 样品来源 选用当天门诊患者血糖值在 7.0、19.2、24.2 mmol/L 的样品 3 份, 在高值血清中加纯品葡萄糖粉自制 1 份特高值样品。

1.2 仪器与试剂 日本岛津 CL-8000 全自动生化分析仪。上海科华公司生产的双试剂葡萄糖氧化酶法试剂盒。

1.3 方法

1.3.1 设置岛津 CL-8000 5 种模式相同的仪器参数 见表 1。按表 1 所要求的不同条件, 以每一个模式为一个测试项目, 设置岛津 CL-8000 生化分析仪的相关参数, 5 种模式相同的参数设置是: 在 Ready 状态下, 进入 Environment 中将 Automatic Rerun/Adding 选为 On, 即打开自动重做功能。在 Ready 状态下, 进入 Request 将 Automatic Rerun/Adding 选中, 此时凡符合自动重做条件的实验项目即执行自动重做功能。在 Ready 状态下, 按照 Parameter Test Master photometry 选中项目 GLU, 进入 Detail 设置好样品类型, 单位, 小数点, 方法类型, 波长; 再进入 Reagent Condition 页面进行试剂量的设定; 进入 Calibration 页面进行标准位置, 定标类型等参数相关设定。然后进入 Sampling Condition 页面进行样品参数设定, 在 Sample vol 1 中输入 4 μ L, 2 中输入 2 μ L; 在 Condition 一栏中选中 First Run, 执行 1; 选中 Above V-Range 执行 2; 选中 Super High 执行 2; 选中 Over Absortance 执行 2。再进入 Range: Limit Condition 页面进行正常范围, 线性范围, 反应方向等参数的设定, 尤其在 Technical Limit 选项中先选中 Above 再在 Limit 输入限定的最高吸光度值。

表 1 岛津 CL-8000 对葡萄糖的不同标本处理分析

模式类别	限制参数	标本处理	
		原始量	超限处理量
模式 1	HIGH≤24; ABS≤1 100 mAbs	4 μL	不稀释, 二次取样 2 μL
模式 2	反应点从 33 延长至 50; HIGH≤24; ABS≤1 100 mAbs	4 μL	不稀释, 二次取样 2 μL
模式 3	无限制; HIGH≤27.8; ABS≤2 500 mAbs	4 μL	不处理
模式 4	HIGH≤24; ABS≤2 500 mAbs	4 μL	不稀释, 二次取样 2 μL
模式 5	ABS≤1 100 mAbs; HIGH≤27.8	4 μL	不稀释, 二次取样 2 μL

1.3.2 设置岛津 CL-8000 5 种模式不同的仪器参数 模式 1 在 Limit Condition 页面进行线性范围设置时, 设为 0~24; 在 Technical Limit 选项中在 Limit 项中输入限定的最高吸光度值为 1 100 mAbs。模式 2 仅在模式 1 的基础上将反应终点从 33 点延长到 50 点, 使反应达到充分完全。模式 3 在 Limit Condition 页面进行线性范围设置时, 设为试剂说明书提供的 0~27.8 的数据; 在 Technical Limit 选项中在 Limit 项中输入限定的最高吸光度值为 2 500 mAbs。另外在 Sampling Condition 页面进行样品参数设定时, 在 Sample vol 1 中输入 4 μL, 在 Condition 一栏中选中 First Run, 执行 1, 其余不设置。模式 4 仅在模式 1 的基础上在 Technical Limit 选项的 Limit 项中输入限定的最高吸光度值为 2 500 mAbs, 使线性范围最高值 24 成为有效的限制参数。模式 5 在模式 1 的基础上在 Limit Condition 页面进行线性范围设置时, 设为试剂说明书提供的 0~27.8; 使 Limit 项中输入限定的最高吸光度值 1 100 mAbs 为有效的限制参数。

1.3.3 用 5 种模式对 4 种不同的样品进行分析 将 4 种不同的样品放置在样品盘上, 对每一份样品均采用以上 5 种模式进行分析, 直到样品状态显示完成为止。每一份样品重复测 3 次, 结果取均值。

2 结 果

2.1 对自制特高值血清标本, 观察和评价 5 种模式具体的数据和反应曲线, 结果见表 2。 模式 1、4、5 的限制参数均发挥作用, 提示出超限, 并执行 2 的减量测定, 结果理想, 同时各种模式对此标本均表现出底物耗尽现象, 但模式 2 和模式 3 未发现和提示出此种现象, 存在参数缺陷, 实际测定数据误差也较大。

表 2 不同模式对特高浓度血糖测定的结果 (mmol/L)

模式类别	特高值样品结果	
	第一次	超限测定
模式 1	Hight	45.3
模式 2	21.2	—
模式 3	23.1	—
模式 4	Hight	44.5
模式 5	Hight	45.4

注: — 表示无数据。

2.2 选出血糖值在 7.0、19.2、24.2 mmol/L 水平的样品 3 份, 每一份样品重复测 3 次, 测试结果取均值见表 3。 数据显示 7.0 mmol/L 和 19.2 mmol/L 的标本 5 种模式均能准确测定。24.2 mmol/L 标本模式 3 存在参数缺陷, 导致结果误差

较大。

表 3 不同模式对不同浓度血糖测定的结果 (mmol/L)

模式类别	7.0 mmol/L		19.2 mmol/L		24.2 mmol/L	
	水平结果		水平结果		水平结果	
	第一次	超限测定	第一次	超限测定	第一次	超限测定
模式 1	7.03	—	18.8	—	Hight	24.1
模式 2	7.04	—	19.5	—	Hight	24.3
模式 3	7.06	—	18.8	—	23.2	—
模式 4	7.10	—	19.2	—	Hight	24.5
模式 5	7.13	—	18.6	—	Hight	24.2

注: — 表示无数据。

3 讨 论

目前临床生化检验自动化程度越来越高, 几乎全部采用各试剂厂家的成品试剂, 但是我国体外诊断试剂的现状与国际上相比, 无论质量还是监管都有一定的差距^[5], 提供的实验参数缺乏科学性, 如焦连亨^[6]报道的如果对分析化学、酶动力学和对仪器性能没有一定的掌握, 是很难设置好参数的。要根据各实验项目在临床上的具体情况, 各种仪器的性能特点, 合理设置。这就要求设备厂家工程师对设备的各种参数和性能必须熟悉, 并得到恰当的应用。同时试剂厂家对所生产的试剂一定要作出科学的评价, 尤其是试剂吸光度 A 值的最低和最高检测限额以及空白 A 值、线性范围等限制参数必须与实际情况相符。

在仪器方面, 有些仪器为了提高检测速度, 样品在第一次加样后即退出轨道, 仅对结果的高值和超限提出报警, 由实验人员对标本进行稀释重测。有些仪器考虑到标本的稀释重做, 采用圆盘式样品加样, 同时增设自动稀释重做功能, 能很好地完成对每一份样品的测定, 具有代表性的就是日立和岛津系列。

在终点法的设置时, 有些项目反应很快达到终点, 显色稳定。比如三酰甘油、总胆固醇、尿酸等, 可以缩短读点。但有的项目反应慢, 在仪器的一般设定时间内, 达不到终点, 特高值样品显色后又不稳定, 表现出底物耗尽现象。对此类试验一方面除尽可能地延长反应时间, 让反应达到完全外^[7], 还应注意到底物耗尽的现象, 尤其以葡萄糖氧化酶法测定最具代表性。越是特高值的样品, 底物耗尽现象引入的误差越大, 此种情况在糖耐量实验中表现最为突出。也有对葡萄糖氧化酶法一点终点法进行改良的报道^[8], 即在不改变样品与试剂比例的前提下, 将样品与试剂各减半混合, 在仪器测光前(终点前)加入等

量的水稀释混匀,再测定其吸光度。测定线性范围较宽,一般不需对高浓度标本进行稀释。还有将终点法改良为两点法的报道^[9]。

本组研究设置模式 2,以实现延长反应时间,使反应达到终点的目的,同时对线性高值和吸光度 A 值最高限额进行了有效限制。对正常标本和稍高值的标本效果很好,但在对特高值样品测定时,发现反应曲线呈抛物线状降低,表现出底物耗尽的现象,并引入较大的误差,应引起同行的重视。在本研究设置的模式 4 中单独对线性高值进行了有效限制,使超出线性范围的标本均起到了报警和自动减量重做的作用,结果的准确性得到了保证。在设置的模式 5 中单独对吸光度 A 值最高限额进行了有效限制,同样对超限标本均起到了报警和自动减量重做,进一步验证了在日常工作中采用的模式 1 的科学性和正确性。模式 1 也是目前作者认为在实际应用中最为理想的分析模式,它充分利用了有效的线性限制和吸光度 A 值最高限额,对不同浓度的标本均能实现准确测定。对于模式 3 设置的线性限制和吸光度 A 值最高限额,均未起到任何限制作用,从本次葡萄糖氧化酶法结果分析,反映出试剂厂家提供的线性范围为 27.8 mmol/L,而实际在 24.5 mmol/L 左右已达到线性极限,同时试剂厂家提供的吸光度 A 值最高检测限额 ABS=2 500 mAbs,在 CL-8000 上仅测到 1 300~1 400 mAbs,导致模式 3 所设置的限制参数起不到任何作用,给高值样品的检测带来很大的偏差^[10]。这种模式个别工程师经常用,应引起注意。

因此要求广大的临床检验人员,在实际工作中不要一味依赖厂家提供的各种参数,要正确分析,合理利用厂家提供的限制参数和试剂比例^[11],注意一些干扰因素^[12],确保对各种标本分析结果的准确性。

(上接第 48 页)

则需大标本量研究。总体而言,该试剂盒结合日立 7600 生化分析仪建立的检测系统检验性能良好,可以满足临床需要。

参考文献

[1] 农世泽,班副植. 胱抑素 C 在临床各种肾病中的应用价值[J]. 检验医学与临床,2013,10(7):858-859.

[2] Zaffanello M, Brugnara M, Franchini M, et al. Is serum procalcitonin able to predict long-term kidney morbidity from urinary tract infections in children[J]. Clin Chem Lab Med,2008,46(10):1358-1363.

[3] 李平,蔡伟娟,张丽翠. 胱抑素 C 尿素和肌酐在不同程度肾病中的临床价值[J]. 检验医学与临床,2012,9(18):2292-2293.

[4] CLSI. Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods; Approved Guideline-Second. CLSI document EP5-A2[S]. Wayne, Pennsylvania, USA: CLSI, 2002.

[5] CLSI. Evaluation of the Linearity of Quantitative Analytical Methods: A Statistical Approach; Approved Guideline. CLSI document EP6-A[S]. Wayne, Pennsylvania, USA: CLSI, 2003.

[6] CLSI. Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples; Approved Guideline. CLSI document EP9-

参考文献

[1] 费维伦,梁春阳. 3 种血清葡萄糖测定方法的比较[J]. 检验医学与临床,2012,9(20):2573-2574.

[2] 朱海燕,苏猛. 对干化学方法快速测定血糖结果的评价[J]. 中外医学研究,2013,11(6):66.

[3] 谢服役,孙琦,吴巧萍. 参考方法测定血清葡萄糖的测量不确定度评价[J]. 浙江医学,2013,35(3):188-191.

[4] 耿素珍. 生化自动分析仪反应监测与葡萄糖测定质量控制[J]. 河北北方学院学报:医学版,2009,26(1):53-56.

[5] 李海宁,母瑞红,任海萍,等. 体外诊断试剂监管现状分析及思考[J]. 中国医疗器械杂志,2011,35(1):68-70.

[6] 焦连亭. 我国生化分析仪临床应用中应注意的若干问题[J]. 中华检验医学杂志,2005,28(5):472-474.

[7] 王翠玉,段樱. 终点法反应平衡时间的试验观察[J]. 陕西医学检验,2002,17(1):33-34.

[8] 黄健,张刘冬. 改良终点法在临床生化检验中的应用探讨[J]. 海南医学,2010,21(22):46-47.

[9] 赵燕霞,孙光伟. 两点法在血糖测定中的应用[J]. 实用医技杂志,2007,14(18):2411-2412.

[10] 王宝占,李立和. 葡萄糖测定参数设置与质量保证[J]. 现代检验医学杂志,2009,24(6):81-82.

[11] 韩鹏飞,蔡娟. 血清葡萄糖测定在不同试剂/样本比例下的线性实验[J]. 检验医学,2010,25(4):314-316.

[12] 张亚男. 血清葡萄糖测定临床意义[J]. 中国现代药物应用,2012,6(9):43-44.

(收稿日期:2013-06-18 修回日期:2013-09-22)

A2[S]. Wayne, Pennsylvania, USA: CLSI, 2002.

[7] Spanaus KS, Kollerits B, Ritz E, et al. Serum creatinine, cystatin C, and beta-trace protein in diagnostic staging and predicting progression of primary nondiabetic chronic kidney disease[J]. Clin Chem,2010,56(5):740-749.

[8] Peralta CA, Shlipak MG, Judd S, et al. Detection of chronic kidney disease with creatinine, cystatin C, and urine albumin-to-creatinine ratio and association with progression to end-stage renal disease and mortality[J]. JAMA,2011,305(15):1545-1552.

[9] 张勇建,朱瑞宗,杨占良,等. 国内厂家胱抑素 C 试剂的评价方法研究和结果分析[J]. 检验医学与临床,2012,9(11):1293-1294.

[10] 朱应红,陈敏,欧阳家乐. 乳胶增强比浊法胱抑素 C 测定试剂的临床应用评价[J]. 检验医学与临床,2012,9(21):2753-2754.

[11] 李海霞,王学晶,徐国宾,等. 两种不同检测系统测定半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 的方法学评价[J]. 中华检验医学杂志,2009,30(11):1284-1287.

[12] 肖华勇,聂滨. 不同厂家试剂盒检测血清胱抑素 C 的性能比较[J]. 实用医技杂志,2011,18(9):905-907.

(收稿日期:2013-04-18 修回日期:2013-08-28)