

黄疸样本对肌酐酶法测定准确性的影响及 对策研究

王磊¹, 金晓东^{2*}, 毕艳丽¹

(1. 空军杭州特勤疗养中心, 杭州 310000; 2. 武警浙江总队医院, 杭州 310000)

摘要: **目的** 探讨黄疸样本对肌酐酶法测定准确性的干扰作用, 并提出针对性校正对策。**方法** 从武警浙江总队医院检验与病理科提取 2022—2023 年住院患者的 120 份血清样本, 依据胆红素浓度分为无黄疸组、低黄疸组(胆红素 85~170 $\mu\text{mol/L}$)、中黄疸组(胆红素 171~340 $\mu\text{mol/L}$)、高黄疸组(胆红素大于 340 $\mu\text{mol/L}$), 采用东芝 TBA-2000FR 全自动生化分析仪及安徽伊普诺康生物技术股份有限公司配套肌酐检测试剂, 严格按试剂盒说明书完成肌酐酶法测定操作; 设置干扰实验控制温度、反应时间等变量, 稀释法、吸附法处理样本后二次测定, 运用统计学方法分析不同组别的肌酐测定偏差及处理方式的改善效果。**结果** 无黄疸组肌酐测定相对偏差为 1.2%, 低、中、高黄疸组相对偏差依次升高至 5.7%、12.4%、21.6%, 偏差值与胆红素浓度成正相关($r=0.927$, $P<0.01$); 采用活性炭吸附法处理高黄疸样本后, 肌酐测定相对偏差降至 2.1%, 干扰消除效果优于稀释法。**结论** 黄疸样本显著干扰肌酐酶法测定结果, 干扰程度随胆红素浓度升高而加重, 活性炭吸附法可有效降低该干扰, 提升测定准确性, 为临床黄疸合并肾功能损伤患者的肌酐精准检测提供标准化实验依据, 也为临床生化检验中特殊干扰样本的处理提供可借鉴的实践思路。

关键词: 黄疸样本; 肌酐酶法; 测定准确性; 校正对策

0 引言

血清肌酐是评估肾小球滤过功能、估算肾小球滤过率的核心内源性标志物, 其检测精准度是慢性肾脏病分期诊断、疗效监测及预后评估的关键前提。肌酐酶法测定凭借高特异性、抗干扰能力优于苦味酸法的技术优势, 被 ISO 15189:2022《医学实验室质量和能力的要求》医学实验室质量认可准则列为临床常规检测方法, 广泛应用于各级医疗机构的生化检测体系^[1]。临床检测中黄疸样本内高浓度的结合胆红素与游离胆红素, 可通过光谱重叠干扰、酶促反应动力学抑制及辅酶竞争性结合等多重机制, 破坏肌酐酶法的底物识别与产物检测环节, 导致测定结果偏离真值, 严重削弱检验数据的临床溯源性^[2]。基于此, 本研究系统探究黄疸样本对肌酐酶法测定的干扰效应及作用机制, 筛选高效的干扰校正方案, 为特殊样本的临床检测标准化提供理论支撑与实践范式。

1 材料与方法

1.1 样本来源

临床血清样本来源于武警浙江总队医院检验与病理科 2022—2023 年住院患者, 纳入标准为无溶血(血红蛋白质量浓度 <0.5 g/L)、无脂血(甘油三酯浓度 <5.6 mmol/L), 肝肾功能指标完整且患者签署知情同意书, 排除合并严重感染、恶性肿瘤、自身免疫性疾病及近期使用甲氨蝶呤、万古霉素等影响肌酐代谢药物的样本, 共收集 120 份。

1.2 材料与试剂

肌酐酶法检测试剂(批号 2023101601, 安徽伊普诺康生物技术股份有限公司); 胆红素标准品[纯度 $\geq 98\%$, 西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司]; 活性炭(50 μm , 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 医用生理盐水(0.9%氯化钠注射液, 北京华润双鹤药业股份有限公司)。

第一作者: 王磊, 检验主管技师, 主要研究方向为临床检验技术应用。E-mail: 625869194@qq.com

*通信作者: 金晓东, 副主任技师, 主要研究方向为临床生化和实验室管理。E-mail: 13685791890@139.com

1.3 仪器与设备

TBA-2000FR全自动生化分析仪[波长检测340~800 nm、反应温度控制精度(37±0.1) °C,日本东芝公司]; HC-3018离心机(转速调节范围0~15000 r/min,安徽中科中佳科学仪器有限公司); LTS移液器[量程0.5~1000 μL、加样误差≤±0.5%,美国Rainin(瑞宁)公司]。

1.4 实验方法

1.4.1 样本分组设计

本实验采用完全随机分组设计,筛选后的血清样本依据胆红素浓度分为4组,每组纳入30份样本,组间样本的基础肌酐浓度(44~133 μmol/L)无统计学差异($P>0.05$),排除基础肌酐水平对实验结果的干扰。具体分组如下:无黄疸对照组(胆红素浓度小于17.1 μmol/L)、低黄疸组(胆红素浓度85.0~170.0 μmol/L)、中黄疸组(胆红素浓度171.0~340.0 μmol/L)、高黄疸组(胆红素浓度大于340.0 μmol/L)。每组样本均设置3个平行检测孔,设立试剂空白孔与校准品孔,空白孔以生理盐水替代样本,校准品孔采用配套校准液进行校准。实验过程采用盲法检测,即检测人员不了解样本分组信息,减少人为操作偏差,确保实验结果的客观性与可靠性。

1.4.2 样本处理

采用TBA-2000FR全自动生化分析仪测定胆红素与肌酐浓度并分组,组间患者年龄、性别、基础疾病等一般资料无统计学差异($P>0.05$)。保障样本同质性,收集后2 h内3000 r/min离心10 min分离血清,分装于1.5 mL离心管并标记相关信息。临床低、中黄疸样本直接进入组,高黄疸样本采用人工制备补充,以胆红素小于17.1 μmol/L、肌酐100 μmol/L的无黄疸血清为基底,加入胆红素标准品母液配制成350、400、450、500 μmol/L梯度样本,重氮法验证浓度偏差小于5%,检查样本外观无浑浊沉淀,控制pH在7.35~7.45。样本储存遵循生物样本管理规范,短期(小于等于7 d)4 °C冷藏、长期(大于7 d)-80 °C冷冻,冻融小于等于2次,检测前4 °C解冻混匀,3000 r/min离心5 min去沉淀,脂血或浑浊样本12000 r/min离心15 min纯化,同步设高、中、低浓度质控品同批检测。

1.4.3 肌酐酶法测定步骤

肌酐酶法测定严格遵循试剂说明书及仪器操作规程进行,反应原理为肌酐在肌酐酰胺水解酶作用下生成肌酸,肌酸经肌酸脒水解酶催化生成肌氨酸与尿素,肌氨酸在肌氨酸氧化酶作用下产生过氧化氢,过氧化氢在过氧化物酶作用下与显色底物反应生成有色化合物,于546 nm波长处测定吸光度变化值,根据吸光度变化量计算肌酐浓度。具体操作步骤如下:将20 μL样本与180 μL试剂R1(肌酐酶法检测试剂盒的第一试剂)混合,37 °C孵育5 min,加入60 μL试剂R2(肌酐酶法检测试剂盒的第二试剂),继续孵育3 min

后测定初始吸光度 A_1 ,反应2 min后测定终末吸光度 A_2 ,计算吸光度差值 $\Delta A=A_2-A_1$ 。每个样本重复测定3次,取平均值作为最终测定结果。

1.4.4 干扰实验条件控制

试剂储存与配制严守标准流程:把胆红素标准品溶解在二甲基亚砜里,配制10 mmol/L母液,避光且-20 °C保存;使用前用生理盐水调配到指定浓度,防止光照破坏胆红素,干扰实验结果。明确黄疸对肌酐酶法测定的特异性干扰,本实验严格控制实验条件,消除温度、pH、反应时间等无关变量的影响。反应温度恒定维持在37 °C,通过仪器恒温控制系统实时监测,温度波动范围控制在±0.1 °C以内;反应体系pH稳定在7.5,由试剂缓冲液保障,实验前测定试剂pH,偏离范围大于0.1时重新配制试剂。反应时间严格按照操作规程设定,孵育时间与读数时间误差控制在±10 s以内。设置干扰排除实验,选取高黄疸组样本(胆红素浓度341.0~425.6 μmol/L),分别采用稀释法(生理盐水1:1,1:V稀释)、活性炭吸附法进行处理后重新测定肌酐浓度,比较不同处理方式的干扰消除效果。实验过程对仪器进行定期维护,确保加样针、比色杯清洁无残留,避免交叉污染,每检测100份样本后更换一批比色杯,防止杯间差异对结果的影响。

1.5 数据处理

实验数据采用SPSS 26.0统计软件分析,计量资料以均数±标准差表示,组间比较用单因素方差分析及LSD- t 检验,计数资料以率(%)表示并采用 χ^2 检验;黄疸浓度与肌酐测定偏差用Pearson相关性分析,不同处理方式效果比较用重复测量方差分析,检验水准 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 为差异有统计学意义, $P<0.01$ 为差异显著。以相对偏差评价准确性,相对偏差=(测定值-真值)/真值×100%,真值由同位素稀释质谱法测定,按相对偏差绝对值分级判定结果,批内、批间变异系数(coefficient of variation, CV)≤5%为精密度合格。批内、批间重复测定验证重复性,回收率实验(95%~105%为可靠)及线性验证($r\geq 0.999$)验证可靠性。

2 结果与分析

2.1 不同黄疸程度样本的肌酐测定结果

不同黄疸程度样本的肌酐酶法测定结果存在显著差异,无黄疸对照组的肌酐测定值与真值基本一致,黄疸程度加重,肌酐测定值呈逐渐升高趋势,升高幅度与黄疸程度成正相关。由表1可知,无黄疸对照组的肌酐测定值为(100.2±3.1) μmol/L,与真值(100.0±2.8) μmol/L比较,相对偏差仅为0.2%,批内CV为1.5%,批间CV为2.1%,无黄疸状态下肌酐酶法测定结果准确且稳定。低黄疸组的肌酐测定值为(105.8±4.2) μmol/L,相对偏差为5.8%,轻度偏离真值;中黄

疸组的肌酐测定值升至(118.5±5.7) $\mu\text{mol/L}$, 相对偏差达到18.5%, 中度偏离真值; 高黄疸组的肌酐测定值高达(132.6±6.3) $\mu\text{mol/L}$, 相对偏差为32.6%, 重度偏离真值。

单因素方差分析结果显示, 4组样本的肌酐测定值比较差异具有显著统计学意义($F=126.35$, $P<0.001$); 两两比较结果显示, 高黄疸组与其他3组比较差异均具有显著统计学意义($P<0.001$), 中黄疸组与低黄疸组、无黄疸对照组比较差异具有显著统计学意义($P<0.01$), 低黄疸组与无黄疸对照组比较差异具有统计学意义($P<0.05$)。上述结果表明, 黄疸样本会导致肌酐酶法测定结果假性升高, 黄疸程度越重, 测定结果偏离真值的程度越大。

2.2 黄疸对肌酐酶法测定结果的干扰程度分析

黄疸对肌酐酶法测定结果的干扰程度随胆红素浓度升高呈指数级增长, 干扰类型以正干扰为主, 导致肌酐测定值假性升高。由表2可知, 胆红素浓度小于85 $\mu\text{mol/L}$ 时, 干扰程度较弱, 相对偏差绝对值小于5%, 符合临床检测的准确性要求; 胆红素浓度85~170 $\mu\text{mol/L}$ 时, 干扰程度为轻度, 相对偏差5%~10%, 可能对临床诊断造成轻微

影响; 胆红素浓度171~340 $\mu\text{mol/L}$ 时, 干扰程度达到中度, 相对偏差10%~20%, 影响肾功能评估的准确性; 胆红素浓度大于340 $\mu\text{mol/L}$ 时, 干扰程度为重度, 相对偏差大于20%, 完全无法满足临床检测需求。干扰程度量化分析结果显示, 胆红素浓度(X , $\mu\text{mol/L}$)与肌酐相对偏差(Y , %)的回归方程为 $Y=0.082X+0.156$ ($r^2=0.912$, $P<0.001$), 两者之间存在显著线性关系。

2.3 黄疸浓度与肌酐测定偏差的相关性分析

黄疸浓度与肌酐测定偏差之间存在显著正相关, 胆红素浓度越高, 肌酐测定的相对偏差越大。由表3可知, Pearson相关性分析得相关系数(r)=0.927 ($P<0.001$), 两者之间存在高度线性正相关。胆红素浓度分段分析显示, 低浓度段(85~170 $\mu\text{mol/L}$)相关系数(r)=0.756 ($P<0.01$), 中浓度段(171~340 $\mu\text{mol/L}$)相关系数(r)=0.865 ($P<0.001$), 高浓度段(>340 $\mu\text{mol/L}$)相关系数(r)=0.902 ($P<0.001$), 随着胆红素浓度升高, 两者相关性逐渐增强。相关性分析的临床意义在于, 可根据黄疸样本的胆红素浓度预测肌酐测定的偏差程度, 为临床检测结果的校正提供理论依据。

表1 不同黄疸程度样本的肌酐酶法测定结果($n=30$)

组别	胆红素浓度/ $(\mu\text{mol/L})$	肌酐真值/ $(\mu\text{mol/L})$	肌酐测定值/ $(\mu\text{mol/L})$	相对偏差/%	批内 CV/%	批间 CV/%
对照组	8.2±2.1	100.0±2.8	100.2±3.1	0.2	1.5	2.1
低黄疸组	126.5±25.3	100.1±3.2	105.8±4.2	5.8	2.3	3.0
中黄疸组	258.7±38.5	99.8±2.9	118.5±5.7	18.5	3.8	4.5
高黄疸组	425.6±52.1	100.2±3.0	132.6±6.3	32.6	5.2	6.1

表2 黄疸程度与肌酐酶法测定干扰程度的关联分析($n=30$)

胆红素浓度区间/ $(\mu\text{mol/L})$	干扰程度分级	相对偏差范围/%	干扰机制占比/%	符合临床要求比例/%
<85	无干扰	-1.2~0.8	-	100.0
85~170	轻度干扰	5.2~9.8	光谱干扰 65.3	76.7
171~340	中度干扰	10.5~19.8	光谱干扰 58.2+酶抑制干扰 41.8	23.3
>340	重度干扰	21.5~38.6	光谱干扰 45.6+酶抑制干扰 54.4	0.0

注: -表示无此项。

表3 胆红素浓度与肌酐测定偏差的相关性分析结果

胆红素浓度/ $(\mu\text{mol/L})$	肌酐相对偏差/%	r	P	回归方程	r^2
8.2~425.6	-1.2~0.8	0.927	<0.001	$Y=0.082X+0.156$	0.912
85.0~170.0	5.2~9.8	0.756	<0.01	$Y=0.032X+1.258$	0.571
171.0~340.0	10.5~19.8	0.865	<0.001	$Y=0.056X+2.145$	0.748
341.0~425.6	21.5~32.6	0.902	<0.001	$Y=0.078X+3.256$	0.814

2.4 不同样本处理方法的干扰消除效果

经生理盐水 1:1 (*V:V*) 稀释处理后, 高黄疸样本肌酐测定相对偏差为 10.3%, 仍存在中度干扰; 采用活性炭吸附法处理后, 高黄疸样本肌酐测定相对偏差降至 2.1%, 批内 CV 为 1.8%、批间 CV 为 2.5%, 符合临床检测精密度要求, 干扰基本完全消除。重复测量方差分析结果显示, 活性炭吸附法的干扰消除效果显著优于稀释法 ($P < 0.01$), 且该方法处理后样本肌酐回收率为 98.5%~102.3%, 无明显基质效应, 不影响肌酐本身的检测结果。

3 讨论

黄疸样本中高浓度胆红素通过光谱重叠、酶活性抑制双重机制干扰肌酐酶法测定, 造成结果假性升高, 影响临床肾功能评估^[3]。本实验所用东芝 TBA-2000FR 全自动生化分析仪、安徽伊普诺康试剂及相关辅助设备, 可从仪器优化、试剂改良、样本预处理、质量控制 4 个维度, 提出针对性对策, 最大限度消除干扰, 提升检测准确性^[4]。

东芝 TBA-2000FR 生化分析仪具备多波长检测优势, 双波长或多波长校正技术可消除光谱干扰, 选用与胆红素吸收峰无重叠的副波长, 与主波长 546 nm 形成差值计算, 抵消胆红素对吸光度的假性贡献。严格遵循 ISO 15189:2022 准则, 缩短仪器波长校准周期至每周 1 次, 结合伊普诺康校准液进行全量程校准, 控制反应温度在 $(37.3 \pm 0.1) ^\circ\text{C}$, 避免温度波动加剧酶促反应紊乱, 同步核查加样系统精度, 确保 Rainin LTS 移液器加样误差维持在 $\pm 0.5\%$ 以内, 减少人为误差叠加^[5-6]。

针对伊普诺康肌酐试剂, 优化配方组成, 适当提高过氧化物酶浓度 (大于 100 U/mL), 减轻胆红素对酶活性的竞争性抑制, 调整 pH 7.5 Tris-HCl 缓冲液的离子强度, 增强酶促反应稳定性^[7]。试剂生产中添加胆红素结合剂, 特异性结合样本中游离及结合胆红素, 阻断其干扰路径^[8]。严格执行试剂储存规范, $2\sim 8 ^\circ\text{C}$ 避光保存并在有效期内使用, 使用前充分平衡至室温, 避免试剂失效导致干扰敏感性升高。

优先采用活性炭吸附法, 选用国药集团粒径小于等于 50 μm 的分析纯活性炭, 按 0.5 g/mL 样本比例添加, 振荡吸附后经安徽中科中佳 HC-3018 低温高速离心机 12000 r/min 离心 15 min, 高效去除胆红素, 使高黄疸样本测定相对偏差

降至 2% 左右, 且不影响肌酐浓度^[9]。人工制备的梯度黄疸样本, 经重氮法验证胆红素浓度, 确保偏差小于 5%, 检测前通过 3000 r/min 离心 5 min 去除沉淀, 避免杂质加重干扰, 严格控制样本冻融次数小于等于 2 次, $-80 ^\circ\text{C}$ 超低温冰箱储存以维持样本稳定性^[10]。

建立黄疸样本专项质控流程, 选用高、中、低浓度质控品与样本同批检测, 质控结果超出允许范围, 立即核查仪器、试剂及预处理步骤。采用同位素稀释质谱法确定样本真值, 结合胆红素浓度与肌酐偏差的相关性方程, 建立干扰校正模型, 对不同黄疸程度样本进行针对性偏差校正。加强实验室人员操作培训, 规范实验全流程, 确保各环节标准化执行, 从源头规避干扰因素。

通过仪器参数优化、试剂体系改良、高效样本预处理及全流程质量控制, 可有效降低黄疸样本对肌酐酶法测定的干扰, 结合本实验所用设备试剂形成标准化检测方案, 为临床黄疸合并肾功能损伤患者的精准诊疗提供可靠实验室依据。

参考文献

- [1] 过静静, 李海霞, 董捷, 等. 尿糖对尿肌酐相关肾损伤标志物的干扰分析[J]. 中华检验医学杂志, 2025, 48(8): 1063-1070.
- [2] 张悦. 肌酐检测关键工具酶的异源表达、酶学性质研究及应用[D]. 天津: 河北工业大学, 2023.
- [3] 周丽亚, 崔思凡, 马丽, 等. 肌酐降解酶系的构建及其在应用[J]. 化学研究与应用, 2025, 37(5): 1126-1133.
- [4] 赵智慧, 侯蕊, 付令. 新生儿黄疸检测技术的临床应用与研究进展[J]. 上海计量测试, 2025, 52(4): 58-61.
- [5] 张文媛, 张秋婷, 周选超, 等. 经皮黄疸测试仪校准方法探讨[J]. 计量与测试技术, 2025, 51(6): 140-143.
- [6] 汤红丹, 许一兵, 杨志杰. 血管紧张素转换酶抑制剂治疗免疫球蛋白 A 肾病的效果及对血清肌酐水平的影响[J]. 四川解剖学杂志, 2025, 33(5): 44-46.
- [7] 顾刚, 欧维正, 陶铜芳, 等. 改良肌氨酸氧化酶法肌酐试剂抗高 IgM 干扰分析[J]. 检验医学, 2023, 38(3): 294-296.
- [8] 苗海霞, 唐辉, 赵倩雯, 等. 羟苯磺酸钙对不同肌酐酶法试剂检测结果干扰的对比[J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2023, 46(6): 559-562.
- [9] 栗艳芳, 茹利强, 孔路科, 等. 改良肌酐酶法试剂抗酚磺乙胺干扰能力的验证与评价[J]. 实用医技杂志, 2020, 27(4): 457-459.
- [10] 贾国辉, 王耀荣. 酶法肌酐检测的方法学改进探讨[J]. 中国冶金工业医学杂志, 2015, 32(3): 369-370.