

Diabetes Mellitus in Eastern and Southeastern Asia: A Systematic Review and Meta-Analysis. J Diabetes Res. 2018; 2018:10.

6. **Saila B. Koivusalo, et al (2016)**, Gestational Diabetes Mellitus Can Be Prevented by Lifestyle Intervention: The Finnish Gestational Diabetes Prevention Study (RADIEL). Diabetes Care, 39, 24-30.

7. **Siew M.C. (2018)**, Prevalence and risk factors of gestational diabetes mellitus in Asia: a systematic review and meta-analysis, BMC Pregnancy Childbirth, 2018.

8. **WHO (2018)**, Diagnosis of gestational diabetes in pregnancy, The WHO Reproductive Health Library

ĐÁNH GIÁ VÀ SO SÁNH KỸ THUẬT ĐỊNH LƯỢNG CREATININ HUYẾT TƯƠNG BẰNG PHƯƠNG PHÁP ENZYM VÀ PHƯƠNG PHÁP JAFFE TRÊN MÁY HÓA SINH COBAS C503

Đào Thị Quỳnh Nga¹, Trần Thị Chi Mai^{1,2}, Lương Huệ Quỳnh¹

TÓM TẮT

Mục tiêu: Nghiên cứu này được thực hiện để thẩm định và so sánh kỹ thuật định lượng creatinin huyết tương bằng phương pháp enzym và phương pháp Jaffe trên máy hóa sinh Cobas c503. **Phương pháp:** Giới hạn định lượng (LOQ), khoảng tuyến tính, độ chính xác, độ chụm của hai phương pháp được đánh giá. Độ tương đồng kết quả của hai phương pháp được đánh giá bằng thực nghiệm so sánh phương pháp sử dụng 100 mẫu bệnh phẩm theo hướng dẫn của CLSI. **Kết quả:** LOQ của phương pháp enzym là 8,2 μ mol/L, của phương pháp Jaffe là 25,8 μ mol/L. Phương pháp enzym tuyến tính đến 1512 μ mol/L và phương pháp Jaffe tuyến tính đến 1487 μ mol/L. Độ chụm của cả hai phương pháp đều đạt tiêu chuẩn chấp nhận khi so sánh với tiêu chuẩn CLIA. Độ chính xác của cả hai phương pháp đều ở mức mong muốn, độ thu mẫu QC và mẫu thật thêm chuẩn nằm trong giới hạn chấp nhận từ 90- 110%. Có mối tương quan chặt giữa hai phương pháp với $r = 0,999$, tuy nhiên hai phương pháp không tương đồng, phương pháp Jaffe cho kết quả creatinin cao hơn so với phương pháp enzym, đặc biệt là ở mức nồng độ thấp. **Kết luận:** Cả hai phương pháp enzym và Jaffe đều đáp ứng được yêu cầu hiệu năng để đưa vào sử dụng thường quy. Tuy nhiên, phương pháp enzym có hiệu năng tốt hơn ở nồng độ creatinin thấp.

Từ khóa: creatinine huyết tương, phương pháp enzym, phương pháp Jaffe, xác nhận phương pháp, so sánh phương pháp.

SUMMARY

EVALUATION AND COMPARISON OF ROCHE JAFFE AND ENZYMATIC CREATININE METHODS ON COBAS C503 CHEMISTRY AUTO-ANALYZER

¹Bệnh viện Nhi trung ương

²Trường Đại học Y Hà Nội

Chịu trách nhiệm chính: Đào Thị Quỳnh Nga

Email: quynhngadao87@gmail.com

Ngày nhận bài: 28.3.2022

Ngày phản biện khoa học: 23.5.2022

Ngày duyệt bài: 30.5.2022

Objectives: The aim of this study was to evaluate and compare the analytical performance characteristics of the Jaffe and enzymatic methods for plasma creatinine measurement. **Methods:** Two original creatinine methods, Jaffe and enzymatic, were evaluated on Roche C503 automated analyzer via limit of quantitation, linearity, intra-assay and inter-assay precision, and comparability in plasma samples. Method comparison using patient samples according to CLSI guideline were performed on 100 plasma samples by analyzing on the same autoanalyzer.

Results: Enzymatic method had a lower LOQ than Jaffe method, values at 8.2 μ mol/L and 25.8 μ mol/L respectively. Enzymatic method was linear up to 1512 μ mol/L and Jaffe method was linear up to 1487 μ mol/L. The intra-assay and inter-assay precision data were acceptable in both methods when using CLIA criteria. The accuracy of both methods was under desirable level, the recovery of QC and real patient samples was in range of 90- 110%. The high correlations were determined between two methods ($r = 0,999$). However, results of two method were not compatible. Jaffe method gave the higher results than enzymatic method, especially at the low concentrations. **Conclusion:** Both Jaffe and enzymatic methods were found to meet the analytical performance requirement in routine use. However, enzymatic method was found to have better performance in low creatinine levels.

Keywords: plasma creatinine, enzymatic method, Jaffe method, method validation, method comparison.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh thận mạn tính là một trong những vấn đề sức khỏe cộng đồng trên toàn thế giới. Mức lọc cầu thận (GFR) là chỉ số tốt nhất để đánh giá các chức năng thận và xác định bệnh thận mạn tính [1, 2]. Đo lường GFR quan trọng để đánh giá chính xác nguy cơ bệnh, điều chỉnh thuốc, chẩn đoán và phân loại giai đoạn bệnh thận [3]. Creatinin là sản phẩm cuối cùng của quá trình dị hóa creatin ở cơ. Mức độ creatinin huyết tương là xét nghiệm thường quy được sử dụng phổ biến nhất để đánh giá GFR và các chức năng thận [4]. Đây là chỉ dấu tốt của GFR vì biến thiên

cá thể thấp, creatinin là chất nội sinh, được lọc hoàn toàn qua cầu thận và không bị tái hấp thu ở ống thận. Có nhiều phương pháp được sử dụng để định lượng creatinin: phương pháp hóa học và phương pháp enzym trên máy phân tích tự động, sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) và khối phổ pha loãng đồng vị (IDMS) [5]. IDMS là một phương pháp tham chiếu để đo creatinin nhưng không thực tế cho việc sử dụng thường quy. Các phương pháp định lượng creatinin được sử dụng trong các phòng xét nghiệm thường là phương pháp hóa học hoặc phương pháp enzym trên các máy tự động. Phổ biến nhất là phương pháp Jaffe tạo phức hợp creatinine-picric trong môi trường kiềm [5]. Phương pháp Jaffe bị ảnh hưởng bởi một số yếu tố gây nhiễu, vì vậy được cải tiến để giảm thiểu nhiễu bằng đo động học Jaffe và phép tính bù. Nhưng việc bù không hoàn toàn loại bỏ được sai số do sự biến đổi của chất gây nhiễu trong các mẫu bệnh phẩm. Việc sử dụng các phương pháp dựa trên phản ứng enzym có thể cải thiện được tính chính xác của phép đo vì giảm nhiễu của các hợp chất không phải creatinine, nhưng chi phí cao hơn là một bất lợi của phương pháp enzym. Đối với nồng độ creatinine thấp có thể gặp ở trẻ em [5, 6], kết quả của creatinin huyết tương với phương pháp Jaffe sẽ cao hơn so với phương pháp enzym. Phương pháp enzym rất quan trọng đối với các mẫu có nồng độ creatinin thấp hoặc bình thường. Do đó, các xét nghiệm enzym nên được ưu tiên trong các quần thể cụ thể như bệnh nhi hoặc bệnh nhân chạy thận nhân tạo [5, 6].

Khoa Hóa sinh Bệnh viện Nhi trung ương có kế hoạch sử dụng phương pháp enzym thay thế phương pháp Jaffe động học đang sử dụng định lượng creatinin huyết tương. Do vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm thẩm định và so sánh kỹ thuật định lượng creatinin huyết tương bằng phương pháp enzym và Jaffe trên máy hóa sinh Cobas C503.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Chất liệu nghiên cứu. Vật liệu kiểm tra chất lượng (QC) hai mức của Biorad (Lyphocheck Assayed Chemistry Control, lot 26471 và 26472).

Mẫu bệnh phẩm còn dư sau phân tích với các mức nồng độ creatinin khác nhau.

Mẫu bệnh phẩm được thu thập và bảo quản ở nhiệt độ -20°C đến khi phân tích.

Trang thiết bị, hóa chất. Máy sinh hóa tự động Cobas C503 của Roche. Thuốc thử CREJ2 ACN 20470 cho xét nghiệm định lượng creatinin bằng phương pháp Jaffe động học, thuốc thử

CREP2 ACN 20460 cho xét nghiệm định lượng creatinine huyết tương bằng phương pháp enzym dùng trên máy Cobas C503. Chuẩn creatinin dùng trên máy Cobas C503 là Cfas lot 391514. Nước muối NaCl 0.9%. Theo công bố của nhà sản xuất, cả hai phương pháp đều được chuẩn hóa theo ID/MS.

2. Phương pháp

Thực nghiệm đánh giá hiệu năng kỹ thuật của phương pháp

Giới hạn định lượng. Sử dụng dung dịch chuẩn creatinin pha loãng thành các nồng độ thấp. LOQ được xác định là mẫu có nồng độ creatinin thấp nhất mà CV tính được xấp xỉ 20%.

Độ chụm. Sử dụng mẫu QC hai mức nồng độ QC1, QC2 và mẫu trộn từ mẫu bệnh phẩm. Độ lặp lại được đánh giá bằng chạy lặp lại 20 lần trong ngày, độ tái lặp được đánh giá bằng chạy lặp lại trong 20 ngày. Tính giá trị trung bình, SD, CV tại mỗi nồng độ.

Độ chính xác. Độ chính xác của phương pháp được xác định bằng độ thu hồi của mẫu QC mức 1, 2 và độ thu hồi của mẫu bệnh nhân thêm chuẩn.

Khoảng tuyến tính. Lựa chọn 1 mẫu bệnh phẩm có nồng độ gần giới hạn dưới của khoảng tuyến tính (mẫu 1), 1 mẫu có nồng độ gần giới hạn trên của khoảng tuyến tính (mẫu 5). Sau đó trộn hai mẫu trên theo các tỉ lệ khác nhau để tạo: mẫu 2 gồm 3 phần mẫu 1 và 1 phần mẫu 5; mẫu 3 gồm 1 phần mẫu 1 và 1 phần mẫu 5; mẫu 4 gồm 1 phần mẫu 1 và 3 phần mẫu 5. Mỗi mẫu chạy lặp lại 3 lần trong mẻ phân tích.

Thực nghiệm so sánh phương pháp.

Chọn 100 mẫu huyết tương có nồng độ creatinin có nồng độ trải khắp khoảng đo. Tiến hành định lượng creatinin trong các mẫu bệnh phẩm đồng thời trên máy Cobas C503 bằng phương pháp enzym và phương pháp Jaffe. Mỗi ngày phân tích 20 mẫu, trong thời gian là 5 ngày. Khoảng thời gian phân tích 1 mẫu trên hai máy là trong vòng 2 giờ.

Phân tích thống kê. Số liệu được xử lý bằng phần mềm Excel và Method validator của Philip Marquez.

3. Đạo đức nghiên cứu. Nghiên cứu sử dụng mẫu QC và các mẫu bệnh phẩm thừa hủy bỏ sau xét nghiệm. Không sử dụng thông tin bệnh nhân.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

LOQ của phương pháp enzym là 8,2 $\mu\text{mol/L}$, phương pháp Jaffe là 25,8 $\mu\text{mol/L}$ được xác định tại mẫu mà việc đo lặp lại có CV xấp xỉ 20%.

Bảng 1. Độ chụm của hai phương pháp sử dụng mẫu QC

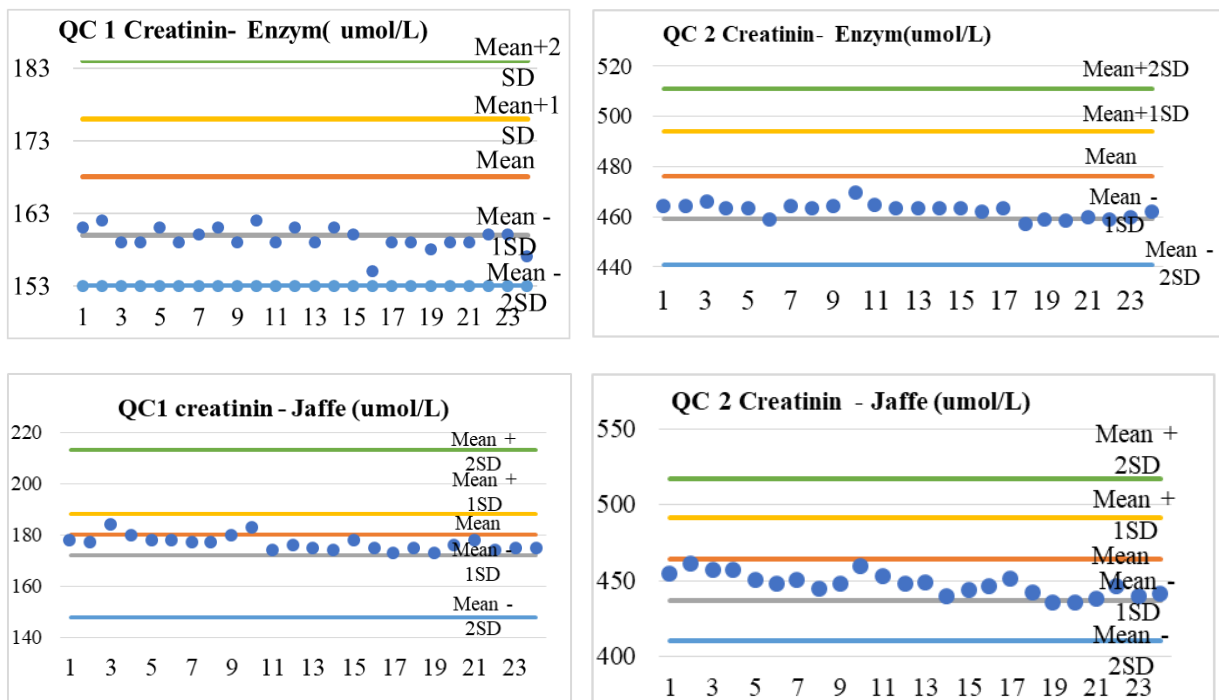
Độ chụm Mẫu	Độ lặp lại				Độ tái lập			
	QC1		QC2		QC1		QC2	
Phương pháp	Enzym	Jaffe	Enzym	Jaffe	Enzym	Jaffe	Enzym	Jaffe
Trung bình (μmol/L)	158,6	179,4	460,2	444,9	159,5	176,8	462,4	447,2
SD (μmol/L)	1,2	2,1	2,2	3,3	1,6	2,9	2,8	7,2
CV (%)	0,74	1,15	0,46	0,73	0,97	1,61	0,61	1,6

Nhận xét: Độ tái lập và độ lặp lại của cả hai phương pháp trên mẫu QC đều tương tự với công bố của nhà sản xuất [7, 8]. Tiêu chuẩn sai số tổng cho phép với xét nghiệm định lượng creatinine huyết tương của CLIA là 15% [9], tiêu chuẩn dựa trên biến thiên sinh học mức mong muốn là 8.87% [10]. Độ lặp lại nhỏ hơn 25% và độ tái lập nhỏ hơn 33% sai số tổng cho phép theo cả hai tiêu chuẩn này. Tuy nhiên, độ chụm của phương pháp enzym tốt hơn phương pháp Jaffe ở cả hai mức QC.

Bảng 2. Độ chụm của hai phương pháp sử dụng mẫu bệnh phẩm

Phương pháp	Độ lặp lại						Độ tái lập					
	Enzym			Jaffe			Enzym			Jaffe		
Mẫu bệnh phẩm	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Trung bình (μmol/L)	48,9	262,8	1109,9	55,2	262,1	1068,3	50,9	260,5	1086,9	55,8	258	1052,6
SD (μmol/L)	0,9	1,6	3,5	1,2	3,3	7,9	1,5	3,9	16,4	1,8	5,3	19,7
CV (%)	1,97	0,62	0,32	2,28	1,28	0,74	2,96	1,5	1,51	3,38	2,07	1,88

Nhận xét: Độ lặp lại và độ tái lập của cả hai phương pháp trên mẫu bệnh phẩm đều chấp nhận được khi so sánh với tiêu chuẩn sai số tổng cho phép của CLIA [9]. Độ tái lập của mẫu bệnh phẩm ở mức nồng độ thấp là 3,38%, cao hơn mức chấp nhận là 2,98% theo tiêu chuẩn biến thiên sinh học mức mong muốn [10]. Nhìn chung, phương pháp enzym có độ chụm tốt hơn phương pháp Jaffe ở cả ba mức nồng độ.



Hình 1. Độ thu hồi mẫu QC bằng phương pháp enzym và phương pháp Jaffe

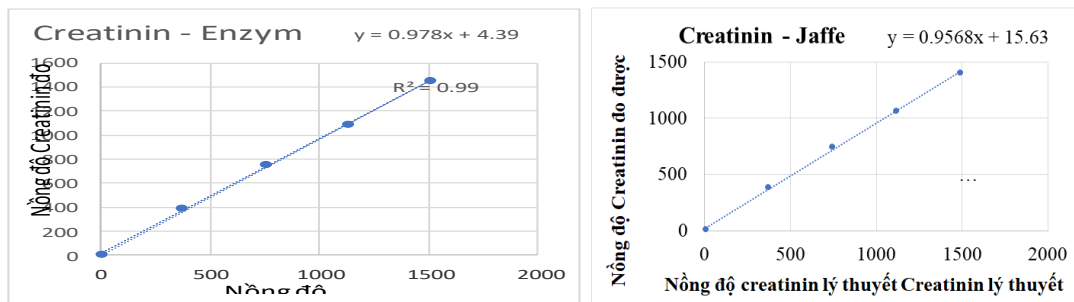
Nhận xét: Kết quả phân tích cho thấy nồng độ creatinin đo được trong hai mẫu QC đều nằm trong khoảng giới hạn cho phép với cả hai phương pháp. Độ thu hồi của phương pháp Jaffe của mức

QC1 và QC2 lần lượt là 98,2% và 96,4%. Độ thu hồi của phương pháp enzym của mức QC1 và QC2 lần lượt là 94,9% và 97,1%.

Bảng 3. Độ thu hồi mẫu thêm chuẩn bằng phương pháp enzym

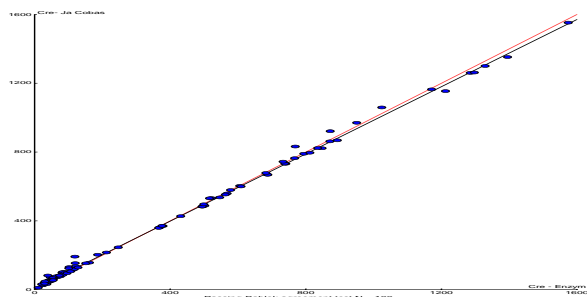
Nồng độ chuẩn Creatinine thêm vào (µmol/L)	336
Nồng độ Creatinine trung bình đo được trong mẫu không thêm chuẩn (n = 20) (µmol/L)	381.1
Nồng độ Creatinine trung bình đo được trong mẫu thêm chuẩn (n = 20) (µmol/L)	375.4
Độ thu hồi trung bình (%)	99.68%
Tiêu chuẩn chấp nhận (%)	90%-110%

Nhận xét: Độ thu hồi mẫu thật thêm chuẩn là 99.68%, nằm trong giới hạn chấp nhận từ 90-110%



Hình 2. Đồ thị biểu diễn kết quả đánh giá khoảng tuyến tính của định lượng Creatinin bằng phương pháp enzym (A) và Jaffe (B)

Nhận xét: Phương pháp enzym tuyến tính đến 1512 µmol/L và phương pháp Jaffe tuyến tính đến 1487 µmol/L.



Hình 3. Biểu đồ Passing- Bablock so sánh kết quả định lượng creatinin bằng phương pháp enzym và phương pháp Jaffe trên máy Cobas c503

Nhận xét: Phương trình tương quan giữa phương pháp enzym và phương pháp Jaffe là $y = 0.977x + 7.71$. Hệ số tương quan $r = 0.999$, 95% khoảng tin cậy của hệ số góc là 0.971-0.984, 95% khoảng tin cậy của giao điểm trục tung là 5.75-8.90.

IV. BÀN LUẬN

Nồng độ creatinin trong huyết tương được sử dụng để xác định mức lọc cầu thận là lý tưởng về chi phí, tính thuận tiện cũng như an toàn. Với việc sử dụng mức lọc cầu thận ước tính ngày càng tăng, việc đặt câu hỏi về các phương pháp phân tích creatinin được đặt ra [6]. Phản ứng Jaffe là phương pháp định lượng creatinine được sử dụng thường xuyên nhất trong các phòng xét

nghiệm, nhưng phương pháp này bị ảnh hưởng bởi một số chất sinh màu không phải creatinin. Phương pháp thường quy phân tích creatinine khác là phương pháp enzym. Tuy nhiên, phương pháp enzym có hạn chế là giá thành cao hơn so với phương pháp Jaffe. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã đánh giá hiệu năng và so sánh kỹ thuật định lượng creatinin huyết tương bằng phương pháp enzym và Jaffe trên máy hóa sinh tự động Cobas C503.

Trong nghiên cứu này, LOQ của phương pháp enzym được xác định là 8,2 µmol/L, công bố của nhà sản xuất là 10 µmol/L, gần với công bố của nhà sản xuất [7]. Tuy nhiên LOQ của phương pháp Jaffe trong nghiên cứu này là 25,8 µmol/L, cao hơn công bố của nhà sản xuất (LOQ nhà sản xuất là 15 µmol/L) [8]. Điều này cho thấy độ lặp của phương pháp Jaffe không tốt ở các mức nồng độ thấp gần giới hạn định lượng. Hạn chế này cần được đánh giá kỹ lưỡng khi áp dụng phương pháp Jaffe động học trên bệnh nhi vì nồng độ creatinin thấp ở một số nhóm tuổi, việc đo lường không chính xác ở các mức nồng độ thấp có thể dẫn đến đánh giá không đúng về chức năng thận ở bệnh nhi trong các nhóm tuổi nhỏ.

Độ chụm của hai phương pháp đều chấp nhận được khi so sánh với tiêu chuẩn sai số tổng cho phép của CLIA (bảng 1 và 2). Tuy nhiên, độ chụm phương pháp enzym tốt hơn phương pháp

Jaffe ở cả hai mức QC và ba mức nồng độ của mẫu bệnh phẩm. Độ tái lập sử dụng mẫu QC với phương pháp enzym có CV lớn nhất là 0,97%, với phương pháp Jaffe có CV lớn nhất là 1,61%. Khi sử dụng mẫu bệnh phẩm đánh giá độ tái lập, phương pháp enzym có CV lớn nhất là 2,96% trong khi phương pháp Jaffe CV lớn nhất là 3,38%. Biến thiên sinh học cá thể của creatinine là 5,95%, tiêu chuẩn chấp nhận của độ chụm mức mong muốn dựa trên biến thiên sinh học là 2,98%. Như vậy, khi sử dụng tiêu chuẩn này thì độ tái lập của phương pháp Jaffe không đạt được ở mức nồng độ thấp với mẫu bệnh phẩm (bảng 2). Nghiên cứu của Kum và cộng sự đánh giá và so sánh phương pháp enzym và phương pháp Jaffe trên máy Abbott cho thấy độ chụm của cả hai đều chấp nhận được khi sử dụng tiêu chuẩn biến thiên sinh học; tuy nhiên xu hướng cũng tương tự nghiên cứu này: phương pháp enzym có độ chụm tốt hơn phương pháp Jaffe [12].

Độ chính xác của cả hai phương pháp được đánh giá bằng độ thu hồi của mẫu QC và mẫu thật thêm chuẩn. Kết quả cho thấy độ chính xác chấp nhận được thể hiện qua độ thu hồi mẫu QC cả hai mức và mẫu thật thêm mẫu chuẩn của cả hai phương pháp đều nằm trong khoảng 90-110% (bảng 3 và hình 1).

Khoảng tuyến tính được đánh giá bằng cách sử dụng mẫu bệnh phẩm mức nồng độ cao pha với mẫu bệnh phẩm nồng độ thấp với các tỷ lệ khác nhau. Kết quả cho thấy phương pháp enzym tuyến tính đến 1512 $\mu\text{mol/L}$ và phương pháp Jaffe tuyến tính đến 1487 $\mu\text{mol/L}$ (hình 2). Theo công bố của nhà sản xuất, phương pháp enzym tuyến tính đến 2700 $\mu\text{mol/L}$ [7], phương pháp Jaffe tuyến tính đến 2200 $\mu\text{mol/L}$ [8]. Hạn chế của nghiên cứu này là không có các mẫu bệnh phẩm có nồng độ cao tương tự như công bố của nhà sản xuất, do vậy khoảng tuyến tính chưa được đánh giá đầy đủ như công bố của nhà sản xuất.

Sự khác biệt giữa kết quả của phương pháp enzym và phương pháp Jaffe trên máy Cobas C503 được thực hiện bằng so sánh kết quả của 100 mẫu bệnh phẩm có nồng độ trải dài khắp khoảng đo. Hai phương pháp có mối tương quan chặt với hệ số tương quan là $r=0,999$ (hình 3). Tuy nhiên, hai phương pháp không tương đồng: 95% khoảng tin cậy của hệ số góc là 0,971-0,984 không bao hàm 1, 95% khoảng tin cậy của giao điểm trục tung là 5,75-8,90 không bao hàm 0 (hình 3). Phương pháp Jaffe có xu hướng cho kết quả cao hơn phương pháp enzym ở mức nồng độ thấp. Kết quả so sánh này cho thấy phòng xét

th nghiệm chỉ có thể sử dụng một trong 2 phương pháp khi thực hiện xét nghiệm creatinin cho người bệnh, đặc biệt là trong theo dõi nồng độ creatinine trên cùng bệnh nhân. Hạn chế của nghiên cứu này là không đánh giá ảnh hưởng của các yếu tố nhiễu đến kết quả của hai phương pháp.

V. KẾT LUẬN

Khi sử dụng tiêu chuẩn sai số tổng của CLIA, hiệu năng của cả hai phương pháp enzym và phương pháp Jaffe định lượng creatinin huyết tương trên máy Cobas c503 đều có thể chấp nhận được để sử dụng trong thực hành thường quy, tuy nhiên phương pháp enzym có giới hạn định lượng thấp hơn và độ chụm tốt hơn, đặc biệt là ở mức nồng độ thấp. Hai phương pháp không tương đồng nên không thể sử dụng đồng thời. Phòng xét nghiệm có thể lựa chọn sử dụng một trong hai phương pháp tùy theo tình hình thực tế.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Laterza OF, Price CP, Scott MG. Cystatin C:** An Improved Estimator of Glomerular Filtration Rate? *Clinical Chemistry*. 2002;48(5):699-707.
2. **Vassalotti JA, Stevens LA, Levey AS.** Testing for Chronic Kidney Disease: A Position Statement from the National Kidney Foundation. *American Journal of Kidney Diseases*. 2007;50(2):169-180.
3. **Stevens LA, Coresh J, Greene T, Levey AS.** Assessing Kidney Function — Measured and Estimated Glomerular Filtration Rate. *N Engl J Med*. 2006;354(23):2473-2483.
4. **Perrone RD, Madias NE, Levey AS.** Serum creatinine as an index of renal function: new insights into old concepts. *Clin Chem*. 1992;38(10):1933-1953.
5. **Myers GL.** Recommendations for Improving Serum Creatinine Measurement: A Report from the Laboratory Working Group of the National Kidney Disease Education Program. *Clinical Chemistry*. 2006;52(1):5-18.
6. **Peake M, Whiting M.** Measurement of serum creatinine--current status and future goals. *Clin Biochem Rev*. 2006;27(4):173-184.
7. **Roche Diagnostics package insert.** CREP2 Creatinine Plus Ver.2. Enzymatic method. Roche Cobas c503.
8. **Roche Diagnostics package insert.** CREJ2 Creatinine Jaffé Gen.2. Jaffe method. Roche/Hitachi Cobas c503.
9. **CLIA Requirements for Analytical Quality.** <https://www.westgard.com/clia.htm>.
10. **Ricos C, Alvarez V, Cava F, Garcia-Lario JV, Hernandez A, Jimenez CV, Minchinela J, Perich C, Simon M.** Current databases on biologic variation: pros, cons and progress. *Scand J Clin Lab Invest*. 1999; 59:491-500. This database was last updated in 2014.