

应用 EP6-A2 方案评价自建检测系统中尿蛋白的线性范围

周远青, 梁瑞莲, 吕伟标, 梁玉全, 陈映慧 (南方医科大学附属顺德第一人民医院检验科, 广东顺德 528300)

【摘要】 目的 建立自建检测系统中尿蛋白的线性范围, 以供临床检验做参考。方法 根据美国临床和实验室标准化协会(CLSI)颁发的 EP6-A2 文件, 配制 11 组 U-pro 浓度为等间距排列的试验标本, 每个样本重复测定 2 次, 用 SPSS 软件对数据进行多项式回归, 得出该项目的线性范围。结果 自建检测系统检测尿蛋白重复性 CV 为 1.59%, 小于实验室所规定的重复性目标 2%, 数据重复性好, 符合实验要求。实验数据经多项式回归分析后得出的最适模型为三次多项式, 通过对其非线性度分析, 判断其为临床可接受的线性, 对应的自建检测系统中检测尿蛋白线性范围为 5.2~1 355.15 mg/L。结论 自建检测系统中尿蛋白的线性范围为 5.2~1 355.15 mg/L, 小于试剂盒说明书上的线性范围 0~2 000 mg/L。临床实验室应对检测系统的分析性能进行评价, 以保证其检测结果的准确可靠。

【关键词】 尿蛋白; 线性范围; EP6-A2 方案; 自建检测系统

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2015.13.034 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2015)13-1898-02

Application of EP6-A2 protocol for evaluating linear range of U-pro testing in self-built test system ZHOU Yuan-qing, LIANG Rui-lian, LV Wei-biao, LIANG Yu-quan, CHEN Ying-hui (Department of Clinical Laboratory, Affiliated Shunde First People's Hospital, Southern Medical University, Shunde, Guangdong 528300, China)

【Abstract】 Objective To establish the linear range of U-pro in the self-built test system for clinical laboratory to provide reference for clinical detection. Methods 11 groups of sample were prepared according to the EP6-A2 document issued by the Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI), which had equal interval U-pro concentrations, every sample was tested twice. The data were conducted the polynomial regression for obtaining the linear range of U-pro by the SPSS software. Results The CV of repeat test in the self-built test system was 1.59%, less than 2% which was ruled in the laboratory, the data were repeatable. After regression analysis on the data, the optimal model was the cubic polynomial, but through analyzing its nonlinearity, it was judged as the acceptable linearity for clinic. The corresponding linear range of U-pro in the self-built test system was 5.20—1 355.15 mg/L. Conclusion

The linear range of U-pro in the self-built test system is 5.20—1 355.15 mg/L, which is less than the linear range of 0—2 000 mg/L provided by the kit instruction. Clinical laboratory should evaluate the analytical performance of testing systems to ensure the accuracy and reliability in the detection results.

【Key words】 U-pro; linear range; EP6-A2; self-built test system

根据“医疗机构临床实验室管理办法”的要求, 临床实验室所用的方法、仪器等应保证检验结果的准确可靠, 临床实验室应对所用的方法学进行评价, 以保证所选用的方法、试剂、仪器达到临床性能、分析性能和经济性能等各方面的要求^[1]。分析性能主要包括精密度、准确性、特异性、抗干扰性、灵敏度、最低检出限、线性范围等, 其中线性范围是较为重要内容之一。自建检测系统指实验室根据自己的意愿选择仪器、校准品、试剂等而建立的检测系统。因本实验室的自建检测系统的线性范围可能与试剂盒提供的线性范围不相符, 为了保证检验结果的可靠性, 需要在检验前建立自建的检测系统中检验项目的线性范围^[2]。本次实验以尿蛋白为例, 实验准备、实验过程和数据处理等根据美国临床和实验室标准化协会(CLSI)最新核准的线性判定指南 EP6-A2 方案设定^[3], 此方案是利用多项式回归分析判定线性, 现报道如下。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 样 品 取尿蛋白浓度超过试剂说明书上线性检测上限的高值(H)样本和尿蛋白定性为阴性的低值(L)样本。

1.1.2 仪器与试剂 仪器为日本 Hitachi 7600-210 型全自动生化分析仪; 试剂为北京利德曼公司生产的脑脊液与尿蛋白测定试剂盒; 校准品为试剂盒配套校准品。

1.2 方 法

1.2.1 配制试验样品 用尿蛋白的高值(H)样品和低值(L)样本, 取 H、L 按 L、0.9 L+0.1 H、0.8 L+0.2 H、0.7 L+0.3 H、0.6 L+0.4 H、0.5 L+0.5 H、0.4 L+0.6 H、0.3 L+0.7 H、0.2 L+0.8 H、0.1 L+0.9 H、H 的比例分别配制 11 组尿蛋白浓度为等间距排列的试验样本。

1.2.2 试验测验 将上述 11 组试验样品在自建检测系统中按随机顺序进行各自项目的测定, 每组样品测试两次。

1.3 计 算

1.3.1 初步数据检查

1.3.1.1 检查数据是否有极端明显的差异和错误, 如有, 找出原因并重做实验。

1.3.1.2 以组数为 X 轴, 测定浓度为 Y 轴绘制散点图, 检查是否存在非常明显的非线性; 判定实验数据有无明显离群值。

1.3.1.3 计算重复性 CV。

1.3.2 多项式回归分析 逐点对数据做一次、二次和三次多项式回归分析,其回归方程分别为 $Y = b_0 + b_1 X$ (回归自由度 $Rdf=2$)、 $Y = b_0 + b_1 X + b_2 X^2$ (回归自由度 $Rdf=3$)、 $Y = b_0 + b_1 X + b_2 X^2 + b_3 X^3$ (回归自由度 $Rdf=4$) 可以借助 SPSS 统计软件完成。计算每个非线性系数斜率的标准差 SE_i (可由回归程序算出), 然后进行 t 检验, 判断非线性系数是否有统计学意义, 即与 0 之间有无差异。

1.3.3 计算线性偏差(DL) 当最适多项式不为线性时, 要计算每个点的 L。每个浓度处的 DL 计算如下: $DL_i = p(X_i) - (b_0 + b_1 X_i)$, X 的取值范围从 X_i 到 X_s , $p(X_i)$ 为最适多项式回归模型在 X_i 处的值, 因而 DL_i 为在每个不同浓度处二次或三次多项式模型与一次多项式(线性)模型的差值。

1.3.4 统计学处理 采用 SPSS18.0 统计软件处理, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 初步判断未发现明显的离群值。

2.2 计算 CV 经计算得出本实验重复性 CV 为 1.59%, 小于实验室所规定的重复性目标 2%, 数据重复性良好。

2.3 逐点回归分析 当 $P < 0.05$ 时, 系数 b 与 0 有明显差异, 该曲线符合此阶数函数, 此时, 回归标准误差小, 说明该模型为适合数据组。见表 1。

表 1 尿蛋白检测线性范围逐点多项式回归

数据点	阶别	回归系数	结果	t	P	回归标准误	最适多项式	
第 1~4 点	一次	b1	363.65	62.15	0.000	18.50	三次	
	二次	b2	-8.16	-1.32	0.243	17.44		
	三次	b2	124.27	3.31	0.035	9.98		
		b3	-17.66	3.35	0.028			
	第 1~5 点	一次	b1	342.15	40.56	0.000	37.73	三次
		二次	b2	-17.70	-4.84	0.002	19.33	
三次		b2	28.92	2.11	0.079	12.09		
		b3	-7.77	-3.45	0.014			
	第 1~6 点	一次	b1	324.64	37.48	0.000	51.24	二次
		二次	b2	-17.58	-8.06	0.000	18.84	
三次		b2	-5.10	-0.41	0.696	18.82		
		b3	-1.66	-1.01	0.344			
	第 1~7 点	一次	b1	299.80	26.82	0.000	83.65	三次
		二次	b2	-21.62	-12.54	0.000	22.33	
三次		b2	0.165	-0.22	0.983	17.41		
		b3	-2.38	-2.85	0.017			

表 2 每个浓度的线性偏离 DL% 值

DL%测定值	第 1~4 点	第 1~5 点	第 1~6 点	第 1~7 点
DL1%	0.550 9	5.015 3	11.267 0	18.138 0
DL2%	0.021 2	0.002 6	0.032 2	0.039 3
DL3%	0.031 7	0.046 6	0.061 7	0.066 5
DL4%	0.012 4	0.033 5	0.043 2	0.079 6
DL5%	—	0.033 0	0.008 6	0.058 4
DL6%	—	—	0.036 2	0.008 8
DL7%	—	—	—	0.069 2

注: — 表示无数据。

2.4 计算线性偏离 第 1 点在四组模型 DL% 都大于 5%, 所以第 1 点不为线性范围所接收。第 1~5 点模型中另外四点 DL% 小于 5%, 而第 1~6 点模型中 DL3% 大于 5%, 第 1~7 点模型中有四点 DL% 大于 5%, 综上所述, 本试验测定的线性范围为第 1~5 点, 即 5.20~1 355.15 mg/L。见表 2。

3 讨 论

近年来, 越来越多实验室按自己的意愿选择检测仪器、试剂、标准品组成自建检测系统, 所选择的检测仪器、试剂、标准品通常不配套或不完全配套, 需对其测量分析线性范围的进行重新评价。

EP6-A2 是 CLSI 最新核准的线性判定指南, 该方案判定线性的多项式回归分析方法, 从统计学和临床要求两个方面判定线性, 其中涉及目测检验、测量数据的精确度检验和多项式回归分析, 此方法目前被认为是判断线性的较好方法^[4-6]。该方案规定当一个新的测量方法(厂家或实验室改良一个实验方法时)需要建立新的线性范围时, 需要 7~11 个能覆盖预期的测量范围的不同浓度的标本。生产商希望有更多的测量点(比预期的线性范围宽 20%~30%), 这样能检测到“拐点”, 就能确定更宽的线性范围。根据不精密度的大小, 每个浓度水平测量 2~4 次。所以为了建立线性范围, 本实验用高值和低值浓度的样本按比例精确配成等间距的不同浓度的 11 个样本随机测定 2 次, 选择的测量浓度范围包含或等于厂家所声明的最低和最高浓度范围^[7]。

EP6-A2 是利用多项式回归分析判定线性。多项式回归的最大优点是可以增加 X 的高阶项对实测点进行逼近直至满意为止, 从而建立最优的多项式方程。另外, 可在每个浓度水平判定非线性度。从本实验可得, 第 1~4 点和第 1~5 点模型并不为线性, 但可以通过测其非线性度判断其仍为临床可接受的线性, 所以用 EP6-A2 线性评价方案是非常客观实用^[8-9]。

结果可得出本实验未发现离群值, 重复测定比例误差 CV 为 1.59%, 小于实验室所规定的误差目标 2%, 数据重复性好。第 1~5 点的数据经回归分析后得出的最适模型为三次多项式, 但通过对其非线性度分析, 判断其仍为临床可接受的线性, 最后得出尿蛋白的线性范围为 5.20~1 355.15 mg/L。得出的线性范围小于试剂盒给的线性范围 0~2 000 mg/L, 所以在临床检验应用中建议大于 1 300 mg/L 时要稀释复查。

实验中用多项式回归分析, 得出的最适模型都不为线性模型, 说明实验过程中存在较大的误差, 但实验重复性良好, 原因可能为加样不准确造成误差。所以在实验操作过程中, 每个步骤都必须严格操作。也可能是基质效应影响了结果, Sviridow 等^[10]的研究表明尿液基质对检测结果有很大影响, 尤其是尿液离子强度, 所以建议用患者尿液为 L 标本。11 组试验数据只有 5 组数据在线性范围以内, 说明实验前尿蛋白 H 设置得太高, 如果更多的点在线性范围内, 测得的线性范围将更为精密。

参考文献

[1] 赵建忠. 生化分析仪精密性、准确性以及线性范围性能验证[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(10): 1111-1112.
 [2] 黄志宏, 付文金, 汤慧华, 等. 多项式线性评价在自建生化检测系统中的初步应用[J]. 检验医学与临床, 2012, 9(1): 93-96.
 [3] CLSI. EP6-A2 Evaluation of the linearity of quantitative (下转第 1901 页)

中均明显高于非 RA 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。在临床中, RF 及抗 CCP 抗体可作为 RA 的特异血清指标, 提供重要的临床诊断参考价值^[5]。RF 阳性率除了在 RA 中占有绝对优势外, 在 MCTD、SS、UCTD 及 SLE 等疾病中均表现为相对较高的阳性率, 在文献^[6]中曾提及 RF 阳性率在 SLE 中大致为 20%, 与本研究结果较为一致。SS 因为其原发性或继发性不同所决定的治疗方式大不相同, 所以选择合适的血清标志物对其进行鉴别十分必要^[7]。RF 阳性率在两者中没有明显区别, 但抗 CCP 的特异性却相对较高, 所以可以作为临床鉴别的重要指标, 这也与文献^[8]中提及的基本一致。但在大多数文献报道中抗 CCP 抗体的特异性可达到 92%~98%, 而本文结果仅为 64.97%, 分析后发现这一差异可能与选取患者中关节肿胀或痛有关, 这提示抗 CCP 抗体是否阳性可能与关节侵蚀、浸润程度有关。曾有报道还提及慢性活动性肝炎患者体内 RF 也可出现阳性^[9], 在本文中由于病例数未将其涵盖在内, 所以没有相关报道结果。

抗 CCP 抗体在诊断患者是否为 RA 中一直有相当高的特异性^[10], 随着近年来风湿性疾病研究的不断加深, 越来越多的报道提及在其他非 RA 疾病中抗 CCP 抗体阳性率也较高^[11]。本次研究结果表明, 其在 SS、UCTD 及 MCTD 中阳性率较高, 这与文献^[12]报道的结果基本一致。但在大多数文献中其在 SS 中阳性率大致在 10% 以内, 但在本研究结果中则显示为 50%, 分析此种差异应该与地区差异有一定关系^[13]。通过对上述两个特异性较高的血清标志物分析发现, 当 RA 的血清标志物如 RF、抗 CCP 抗体等均阳性, 也不能完全排除是其他非 RA 疾病。

针对 SS 及 SLE 疾病中, RA 血清标志物阳性率出现相对较高的现象, 不少专家学者经过细致研究发现, 一旦 SLE 患者发生关节侵蚀, 则有更高的概率表现为 RA 血清标志物阳性。该项结果表明 RF 及抗 CCP 抗体对侵蚀性疾病可能表现为特异性升高, 而且 RA33 抗体在此类疾病中阳性更为明显。在本次研究中, 抗 RA33 抗体阳性率相对于其他血清标志物明显增高, 也验证上述文献观点。所以, 上述 3 种血清标志物很可能作为未来诊断非 RA 如 SLE 侵蚀性病变的特异性指标。

综上所述, 非 RA 患者中 RA 相关血清标志物阳性率低于 RA, 但临床上仍需仔细鉴别, 才能准确诊断。

参考文献

[1] 侯勇, 赵岩. 类风湿关节炎的诊断和治疗进展[J]. 实用医学 (上接第 1899 页)

measurement procedures: a statistica approach. approved guideline[S]. Wayne, PA: CLSI, 2003.

[4] 周琦, 李少男, 李小鹏, 等. 利用美国国家临床实验室标准化委员会 EP6-A 指南判定线性[J]. 中华检验医学杂志, 2006, 29(1): 85-86.

[5] 张晓耕, 王培昌, 刘辰庚, 等. ADVIA 2120 全自动血球分析系统 HGB、RBC 及 WBC 线性范围的测定与评价[J]. 中国实验诊断学, 2009, 13(5): 658-661.

[6] 徐传华. AU640 检测系统测定胱抑素 C 的分析测量范围和临床可报告范围的验证[J]. 检验医学与临床, 2010, 7(22): 2501-2502.

[7] Tholen DW. Evaluation of linearity using the newly ap-

院临床杂志, 2011, 8(2): 8-10.

[2] 张慧涨, 方强. 抗 CCP 抗体检测对类风湿关节炎的临床诊断价值[J]. 中国老年学杂志, 2012, 32(6): 1243-1244.

[3] 牟方祥, 吴红, 邹德生, 等. 非类风湿关节炎患者中类风湿关节炎相关血清标志物阳性的临床意义[J]. 中华风湿病学杂志, 2014, 18(4): 267-269.

[4] 刘荣清, 孙伯坚, 李亚平, 等. 类风湿关节炎活动期滑液中葡萄糖 6-磷酸异构酶水平及与抗环瓜氨酸肽抗体的关系[J]. 中华风湿病学杂志, 2011, 15(11): 739-741.

[5] 秦望森, 邓予晖, 许泼实. RF、抗 RA33 抗体、抗 CCP 抗体联合检测在类风湿关节炎诊断中的应用[J]. 检验医学, 2011, 26(10): 703-705.

[6] 邵耀明, 倪芳颖, 陈国千. 类风湿关节炎实验诊断指标的比较分析[J]. 中国实验诊断学, 2011, 15(10): 1655-1656.

[7] 李婷, 包军, 殷健, 等. 抗环瓜氨酸多肽抗体在类风湿关节炎诊断中的价值[J]. 中华内科杂志, 2011, 50(2): 99-101.

[8] 孙建, 刘章锁, 刘东伟. 血清 C 反应蛋白水平对难治性类风湿关节炎的预测价值[J]. 郑州大学学报: 医学版, 2012, 47(3): 382-384.

[9] 吴定昌, 肖婷, 黄超林. 血清 RF 和抗 CCP 抗体浓度检测在类风湿性关节炎诊断中的临床意义[J]. 中国实验诊断学, 2012, 16(8): 1434-1436.

[10] 张娟, 梅轶芳. 抗 CCP 抗体、AKA、RF 及 GPI 检测类风湿关节炎的临床意义[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2012, 46(5): 492-495.

[11] 刘秀明, 宫怡, 竺红, 等. 血清抗肽酰基精氨酸脱亚胺酶 4 抗体与类风湿关节炎的相关性探讨[J]. 宁夏医科大学学报, 2012, 34(3): 229-233.

[12] 蔡小慧, 吕星, 卿之驹. IgM-RF、IgG-RF、IgA-RF 及抗 CCP 对类风湿性关节炎的诊断价值[J]. 检验医学, 2012, 27(12): 1066-1069.

[13] 潘秋荣, 孙肖依. 多指标联合检测对类风湿关节炎的临床诊断价值[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(13): 1436-1437.

(收稿日期: 2015-01-22 修回日期: 2015-03-18)

prove NCCLS EP6-A protocol[J]. Clin Lab News, 2004, 30(16): 10-12.

[8] 吕赛平, 刘琴, 邹学森. 应用 EP6-A2 方法验证血糖试剂盒的线性范围[J]. 实验与检验医学, 2011, 29(1): 45-46.

[9] 邱方, 张世忠, 冯涛. COBA E601 电化学发光检测系统测定 β -HCG 的分析测量范围和临床可报告范围的验证[J]. 临床检验杂志, 2008, 26(5): 384-385.

[10] Sviridov D, Hortin GL. Urine albumin measurement: effects of urine matrix constituents[J]. Clin Chim Acta, 2009, 404(2): 140-143.

(收稿日期: 2015-01-25 修回日期: 2015-03-10)