

总蛋白改良参考方法的建立及其用于临床检测结果的溯源性研究^{*}

曾瑞丽, 罗燕玲, 林海标, 韩丽乔, 张乔轩, 黄宪章, 王建兵[△] (广州中医药大学第二临床医学院检验科, 广州 510120)

【摘要】 目的 建立测量总蛋白(TP)参考方法, 评价不同实验室 TP 测定结果的溯源性。**方法** 参照美国疾病控制与预防中心推荐的参考方法及相关文件, 建立 37 ℃ 温浴 10 min 的总蛋白参考方法。根据美国临床实验室标准化协会系列文件对方法的精密度、正确度、线性范围等性能进行评价。应用该参考方法对新鲜血清进行赋值作为校准品校准广州 21 家实验室, 比较校准前、后赋值血清校准品、血清样本测定结果间的偏移, 进行检验结果的可比性评价。**结果** 改良参考方法的精密度评价样本浓度为 55.48、88.68 g/L 的 CV 分别为 0.56%、1.23%, 标准参考物质 909C 与靶值的偏移为 1.76%, 分析测量范围上限 128.69 g/L。与参考方法测量结果比较, 赋值血清校准品校准前平均偏移为 6.38%, 校准后降为 1.86%, 样本血清 1、2 校准前偏移分别为 6.04% 和 8.71%, 校准后降为 -1.61%、-0.13%。**结论** 改良的双缩脲法测量 TP 方法性能好, 应用参考方法对新鲜血清进行赋值能够实现不同检测系统结果的溯源性。

【关键词】 总蛋白; 温度; 校准; 参考方法

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2015.17.001 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2015)17-2483-03

Research on establishment of improved reference method for detecting total protein and traceability for its use in clinical detection results^{*} ZENG Rui-li, LUO Yan-ling, LIN Hai-biao, HAN Li-qiao, ZHANG Qiao-xuan, HUANG Xian-zhang, WANG Jian-bing[△] (Department of Clinical Laboratory, Second Clinical College, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510120, China)

【Abstract】 Objective To establish a reference method for detecting the serum total protein (TP) and to evaluate the traceability of the TP detection results by different laboratories. **Methods** The improved reference method of 10 min warm bath at 37 ℃ for detecting TP was established in accordance with the reference method recommended by the US Centers for Disease Control and Prevention and the related documents. The performance of accuracy, precision, linear range was evaluated according to the American Association of Clinical Laboratory Standardization. This reference method was used to conduct the value assignment on fresh as serum calibrator for adjusting 21 laboratories in Guangzhou. The bias of detection results in the assignment serum calibrators and serum samples were compared between before and after calibration. The feasibility evaluation of detection results was performed. **Results** In the precision evaluation by the improved reference method, the coefficients of variation(CV) for two different concentrations of 55.48 and 88.68 g/L were 0.56% and 1.23% respectively, the shift of standard reference substance 909C and the target value was 1.76%, the upper limit of analytical detection range was 128.69 g/L. Compared with the detection results by the reference method, the average shift of the assignment serum calibrator before calibration was 6.38%, which after calibration was decreased to 1.86%, the shifts of sample serum 1 and 2 before calibration were 6.04% and 8.71% respectively, which after calibration were decreased to -1.61% and -0.13% respectively. **Conclusion** The improved biuret method has good performance for detecting TP. Using the reference method for conducting the value assignment on fresh serum can realize the traceability of results by different detection systems.

【Key words】 total protein; temperature; calibration; reference method

总蛋白(TP)是观察肝脏疾病、人体营养状况等常用的检测项目, 临床上采用 37 ℃ 条件下双缩脲法测量, 而美国疾病控制与预防中心(CDC)推荐的 TP 参考方法为 25 ℃ 温浴 60 min 进行测量^[1-2]。25 ℃ 实际操作中温度不好控制, 考虑到临床结果的准确性及不同实验室内检测的一致性, 与临床检测 37 ℃

条件相一致, 本实验室参照美国 CDC 推荐的参考方法, 建立双缩脲法 37 ℃ 温浴 10 min 的 TP 参考方法, 并根据美国临床实验室标准化协会(CLSI)系列文件对方法的精密度、正确度、线性范围等性能进行评价^[2]。同时采用改良参考方法对新鲜血清定植, 了解定植血清校准广州 21 家实验室校准前、后结果与

^{*} 基金项目: 国家科技重大专项基金资助项目(2012ZX09303009-003); 广东省中医院拔尖人才基金资助项目(2011KT647); 2012 年广东省科技计划项目(2012KT1428)。

作者简介: 曾瑞丽, 女, 在读硕士, 主要从事检验结果的量质溯源工作研究。 [△] 通讯作者, E-mail: wangjianbing625@163.com。

靶值的偏移情况,以实现不同实验室 TP 结果的溯源性。

1 材料与方法

1.1 仪器 日立 HITACHI U-3310 紫外可见分光光度计(带半导体温控和磁力搅拌);HAMILTON ML530B 稀释配液仪;美国 Fluke 点式温度计(精度为 0.001 ℃);Eppendorf Research 型移液器;JULABOED-19 型恒温水浴箱;Sartorius CP225D 1/100 000 电子分析天平;Sartorius DOCU-PH 计(精度为 0.001);IKA RH-KT/C 加热磁力搅拌器;Millipore Simplicity UA 型超纯水机;所有高精密度仪器均经广州市计量监督局进行检定。

1.2 试剂 氢氧化钠(NaOH)来自 Sigma 公司,酒石酸钾钠(C₄O₆H₄KNa)、碘化钾(KI)、五水硫酸铜(CuSO₄·5H₂O)来自阿匹斯公司提供,试验用水为法国 Millipore 生产的超纯水(电导率小于 2 s/cm、pH 值为 6~7),按照 IFCC 颁布的 SOP 进行配制。

1.3 标本 (1)2013 国际参考实验室比对标本(RELA-A、RELA-B)用于评价方法的精密度和正确度,同时有证参考物质 909C 用于正确度评价;(2)线性评价试验的标本采用高值新鲜血清,无肉眼可见的溶血、黄疸、乳糜;(3)制备 TP 校准品:为 1 个浓度的新鲜血清,混匀,用参考方法定植,分装保存于-70 ℃以下冰箱,各参加实验室现场取样;(4)用于比对的样本:为 2 个浓度的新鲜血清,保存于-70 ℃。

1.4 参考方法的改良 除去温浴时间的改变,其他均参考美国 CDC 操作。确认水浴温度稳定在(37±1)℃,按测量程序 37 ℃孵育 10 min,测量样本间隔时间均为 3 min,仪器温度也控制为 37 ℃进行标本测量。使用 2013RELA 样本,设置 20 min 内对样本连续测量,观察反应时间与吸光度之间的变化。

1.5 主要性能评价 改良参考方法进行以下评价:(1)精密度评价,参照美国临床和实验室标准协会(CLSI)EP5-A2 文件,选择 2013 年国际参考实验室比对标本(RELA-A、RELA-B),每天每个浓度的标本测量 4 次,连续测量 5 d,各 20 个检测结果,计算均值($\bar{x}$)标准差(s)和变异系数(CV%)^[3];(2)正确度评价,利用 17 家参考实验室所做 2013RELA-A、RELA-B 的均值作为靶值,与用改良参考方法所测的 2013RELA-A、RELA-B 值进行比较,计算其偏移,同时,根据 EP15-A2 文件,用参考方法检测有证参考物质 909C,共检测 6 次,计算均值,比较其与靶值的相对偏移^[4];(3)线性范围建立,参考美国临床实验室标准化研究所(CLSI)的 EP6-A 文件及《临床质量管理技术基础(第 2 版)》,收集本院高值 TP 血清样本作为高值(H),低值血清样本作为低值(L),设 10 个浓度,每个浓度标本检测两次,取均值作为标本最后测量值,所得数据进行拟合多项式回归分析^[5]。

1.6 方法比较 用改良参考方法和美国 CDC 推荐的参考方法分别对以下物质进行检测,并用统计方法处理数据,比较其差异性:2013RELA-A 和 RELA-B;有证参考物质 909C;用于验证线性的新鲜血清标本。

1.7 校准前、后比对试验 (1)21 家实验室进行结果比对,各实验室应对参加本次生化分析仪进行日常维护并保证质控在控。新鲜冰冻患者样本,使用时请先将其置于室温 30 min(若样本在传递过程中已溶化可免去此步骤),溶化后轻轻颠倒混匀 10 次,4 h 内测量,测量过程中注意避免样本蒸发(测量时才

打开样本盖)。按本实验室 SOP 程序测量样本,2 个浓度样本均连续测量 3 次,取均值^[6]。(2)用本实验室所标示的靶值代替实验室校准品的靶值,校准仪器,注意仪器其他测量参数不变。(3)校准后再测量校准品和 2 个浓度样本,每个样本连续测定 3 次,取均值。

1.8 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计学软件和 Microsoft Excel2003 软件进行统计分析。精密度和正确度计算均值、标准差、相对偏移和变异系数等,线性采用多项式回归分析,方法比较采用 *t* 检验分析。

2 结果

2.1 反应完成所需时间 在连续测量中可以看出,样本反应时间到达 10 min 后,其吸光度值基本稳定,得出在 37 ℃孵育 10 min 样本反应可行。

2.2 精密度评价 2013 年国际比对物质 RELA-A 和 RELA-B CV 分别为 0.56% 和 1.23%,不精密度均小于设定目标(<1.5%)。见表 1。

表 1 TP 精密度评价			
项目	均值(g/L)	标准差(g/L)	CV(%)
RELA-A	53.31	0.31	0.56
RELA-B	79.70	0.98	1.23

2.3 正确度评价 测量有证参考物质 909C 均值与靶值的偏移为 1.76%,17 家实验室中有一家实验室结果缺失,即 16 家实验室 2013RELA-A、RELA-B 均值分别为 55.48、80.68 g/L,与用改良参考方法检测出均值的偏移各为 0.29%、1.22%,均小于允许目标(±2.5%)。见表 2。

表 2 TP 正确度评价			
项目	均值(g/L)	靶值(g/L)	偏移(%)
909C	70.21	69.00	1.76
RELA-A	55.32	55.48	0.29
RELA-B	79.70	80.68	1.22

2.4 线性评价 用本实验室建立的 TP 改良参考方法检测 10 个系列浓度的标本其检测结果可用于线性评价。对上述试验数据进行多项式回归分析处理,得到 TP 1、2、3 次多项式模型。见表 3、4。

表 3 TP 参考方法检测 10 个系列浓度结果		
标本号	配制方案	TP(g/L)
1	9L+H	31.48
2	8L+2H	43.77
3	7L+3H	53.00
4	6L+4H	62.94
5	5L+5H	71.65
6	4L+6H	82.92
7	3L+7H	90.56
8	2L+8H	100.77
9	1L+9H	109.17
10	H	128.69

2.5 方法结果比较 三组数据的方差齐性 Levene 结果可看出方差都相等,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 5。

2.6 各实验室校准前、后偏移的比较 各实验室结果去除 2 个离群值,校准前检测赋值血清校准品组的最大偏移为 17.99%,平均偏移为 6.38%;使用改良参考方法定植的蛋白校准品后,最大偏移降为 4.64%,平均偏移降为 1.86%,样本血清 1 样本血清 2 校准前结果为 6.04%和 8.71%,校准后为 -1.61%和 -0.13%。见表 6。

表 4 TP 多项式回归分析结果

阶别	系数符号	系数值	系数 SE	t 检验	自由度	回归标准误
1	b0	21.973	1.862	11.803	—	—
1	b1	10.095	0.300	33.646	16	2.725
2	b0	24.835	3.158	7.864	—	—
2	b1	8.664	1.319	6.568	—	—
2	b2	0.130	0.117	1.113	15	2.685
3	b0	16.438	3.621	4.539	—	—
3	b1	16.111	2.714	5.935	—	—
3	b2	-1.485	0.560	-2.652	—	—
3	b3	0.098	0.034	2.915	14	1.866

注:—表示无数据。

表 5 方法比较统计处理结果

项目	Levene 检验	t 值	df	P 值(双侧)
RELA-A	0.237	-1.872	16	0.080
RELA-B	0.185	-1.263	16	0.225
909C	0.081	0.587	8	0.573
新鲜血清	0.304	0.176	20	0.862

表 6 校准前后结果比较(%)

组别	校准前		校准后	
	偏移范围	平均偏移	偏移范围	平均偏移
赋值校准品	-0.15~17.99	6.38	0~4.64	1.86
血清样本 1	0.54~-29.16	6.04	-0.83~9.11	-1.61
血清样本 2	-0.36~8.13	8.71	0~8.07	-0.13

3 讨 论

TP 是临床常用的生化检查项目,包括清蛋白和球蛋白,其测定对了解机体营养状况,以及肝脏和肾脏病变的诊断、治疗判断与监测等发挥重要作用^[7]。早在 1974 年,美国临床化学协会开展了就血清 TP 的内部试验研究,即用双缩脲法建立测量 TP 的标准^[2]。这就为作者引出了参考方法的概念,参考方法要求测量方法干扰因素少、系统误差很小,又有合适的精密度、特异度和较宽的分析范围。CDC 推荐了在 25℃温浴 60 min 的 TP 参考方法,在实现方法的溯源和临床试验间结果的比对已广泛被应用和认可^[1-2]。

在临床实际检测中,国内实验室采用 37℃温浴条件下双缩脲法测定血清 TP,鉴于此,本实验室参考 CDC 基本操作,建立(37±1)℃温浴 10 min 测量 TP,其方法性能的评价如精密

度、正确度、线性等都达到要求范围内。为了考察吸光度与反应时间的关系,本实验室以 10 min 为界点,评估了 10 min 前的一组吸光度数值(1、2、3、4、5、6、7、8、9 min)和 10 min 后在 10~13 min 内每隔 10 s 的吸光度值,与 10 min 这一点值计算偏移,10 min 前的偏移范围为 0.23%~8.50%,10 min 后偏移范围为 0.05%~0.44%,选择温浴 10 min 比较合适,虽然在温浴 10 min 后的一段时间吸光度仍有所变化,但只要时间控制好,则可保证结果的稳定。

对 21 家实验室校准前后测量结果,与改良参考方法赋值的靶值的偏移结果中发现,赋值血清校准品校准前平均偏移为 6.38%,校准后降为 1.86%,样本血清 1、2 校准前偏移分别为 6.04%和 8.71%,校准后降为 -1.61%、-0.13%,结果表明,通过使用新鲜血清赋值校准不同实验室测量,各实验室结果的准确性和一致性都有极大的提高。由此可见,应用参考方法定植新鲜血清作为校准品进行校准,是实现实验室间量值溯源的有效途径,保证了结果的可比性。在试验过程中,使用了 Sigma 试剂和北京阿匹斯公司试剂在相同条件下对同一物质进行测量,发现试剂的不同其结果有一定偏移。当然,在后续工作中,为更好地实现实验室间、甚至地区间的结果比对,更多更广的实验室、试剂厂家应纳入进来。

参考文献

[1] Doumas BT, Bayse DD, Carter RJ, et al. A candidate reference method for determination of total protein in serum. I. development and validation[J]. Clin Chem, 1981, 27(10):1651-1654.

[2] Doumas BT, Bayse DD, Carter RJ, et al. A candidate reference method for determination of total protein in serum. II. test for transferability[J]. Clin Chem, 1981, 27(10): 1642-1650.

[3] National Committee for Clinical Laboratory Standards. User verification of performance for precision and trueness: approved guideline-second edition[S]. EP15-A2, NCCLS, 2008.

[4] National Committee for Clinical Laboratory Standards. Evaluation of linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach; approved guideline[S]. EP6-A, NCCLS, 2003.

[5] National Committee for Clinical Laboratory Standards. Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach, approved guideline[S]. EP6-A, 2003.

[6] 谭柏松, 刘光明, 张伟坚, 等. 两种不同检测系统测定血清总蛋白的可比性分析[J]. 检验医学与临床, 2013, 10(6): 689-693.

[7] 王时南, 杨欢. 两种校准品和 3 种双缩脲试剂测定血清总蛋白结果偏移评估及方法学评价[J]. 医学研究杂志, 2011, 40(10):125-128.