

• 短篇论著 •

尿液复合室内质控物的研制与评价^{*}

袁咏梅, 刘和录, 何 亚, 杨鸿雅, 於艳霞, 林 洁, 杨庆伟
(广州医学院附属深圳沙井医院检验科, 广东深圳 518104)

摘 要:目的 研制出包含(NAG)和尿微量清蛋白(UMA)两项的复合室内质控物,并初步评价其质量。方法 收集临床肾病患者新鲜尿液,经过处理,制成包含尿 NAG 和尿 UMA 两个项目的复合室内质控物;并依据 CNAS-GLO3 及 ISO Guide 35 的要求,对研制的质控物均匀性、稳定性进行评价。结果 均一性检测 NAG 和 UMA 计算的 F 值分别为 2.32 和 1.54,均小于 $F_{0.05(9,10)}$;稳定性检测 NAG 和 UMA 所得 t 值均小于 $t_{0.05(29)}$ 。结论 本次研制的尿 NAG 和 UMA 2 项复合室内质控物在合适的保存条件下,具备较好的均一性与稳定性,符合临床使用要求。

关键词:自制复合质控物; 均一性; 稳定性

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.15.032

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)15-1986-02

Preparation and evaluation for urine internal multiplex QC material of NAG and UMA^{*}

Yuan Yongmei, Liu Helu, He Ya, Yang Hongya, Yu Yanxia, Lin Jie, Yang Qingwei

(Department of Clinical laboratory, Shenzhen Shajing Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Shenzhen, Guangdong 518104, China)

Abstract: Objective To develop a appropriate intra laboratory QC material for NAG and UMA and then verify the clinical usability of it. Methods Gather clinical fresh urine samples of kidney patients, which were made into QC multiplex material of NAG and UMA. And then according to CNAS-GLO3 and ISO Guide 35, homogeneity and stability of the quality control material were evaluated. Results The values of homogeneity F of NAG and UMA were 2.32 and 1.54, respectively, which were less than $F_{0.05(9,10)}$; the values of stability t of NAG and UMA were less than $t_{0.05(29)}$. Conclusion The self-made intra laboratory QC material for NAG and UMA is stable and homogeneous, and can be used for intra laboratory quality control in clinical laboratories.

Key words: self-made intra laboratory QC material; stability; homogeneity

很多专家学者致力于室内质控物的研制^[1-5],以期能弥补非常规检测项目因缺乏商品化室内质控物而无法实施质量监控的空白,达到满足室内质控的需要。如何验证研制出的质控物质量是否达到要求,是否适用于临床,其均一性与稳定性检测是必不可少的重要环节。本实验室有成功研制室内质控物的经历^[4],本研究设计出尿 NAG 和尿 UMA 2 项复合室内质控物的配制方法,选用合适的质控物基质材料与添加物,按设计方法配制出质控物。参照中国合格评定国家认可委员会的标准文件 CNAS-GLO3 能力验证样品均匀性和稳定性评价指南^[6]及 ISO Guide 35^[7]的要求,通过对研制的尿 NAG 与尿 UMA 复合质控物进行稳定性和均一性检测及数据的统计分析,初步评价其质量。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 贝克曼-库尔特(BECK MAN COULTER)DXC800 全自动生化分析仪,由美国进口。尿 NAG 和 UMA 试剂与校准品为宁波美康生物科技股份有限公司生产,由深圳市艾瑞生物科技股份有限公司代理提供。

1.2 方法

1.2.1 质控物的配制 (1)收集尿 NAG>50 U/L,UMA>60 mg/L(HBSAG 阴性,HCV 抗体阴性,HIV 及梅毒阴性)尿液足量;(2)离心后取上清液经 0.22 μ m 滤膜过滤除菌后加入酶稳定剂和蛋白稳定剂及适量叠氮钠;(3)充分混匀,吸取混合液

按样本检测,符合预期效果后按 200 μ L 一支的规格分装(分装容器均已用小牛血清封闭过),密封胶封口。

1.2.2 瓶间均一性测定 参照文献[6]中均匀性检验“4.2 单因子方差分析”方法和文献[7]的要求进行评价及数据的统计分析。质控物分装后即刻随机抽取 10 管,先按 1 到 10 的顺序检测,再从 10 到 1 的顺序重复测定,所得检测结果计算其总体均值,样品间和样品内的平方和与均方,并由此计算出 F 值。

1.2.3 质控物的保存与稳定性检测 参照文献[6]中稳定性检验“5.2.1 测量平均值与参考值的比较”方法进行评价及数据的统计分析。在保证仪器状态良好的情况下,将配制的质控物分装后随即抽取 30 支上机检测,重复测定 2 次,所得 60 个数据计算出均值(即刻),即为本实验的参考值。其余质控物分成 2 份,分别保存于-20 $^{\circ}$ C、-80 $^{\circ}$ C 条件下备用。在保存 3(-20 $^{\circ}$ C)、6(-20 $^{\circ}$ C)、9(-80 $^{\circ}$ C)、12(-80 $^{\circ}$ C)个月时,各随机抽取 30 支自制质控物上机检测,并分别计算出均值和标准差与即刻均值比较,求出 t 值。

1.3 统计学处理 均一性评价采用单因子方差分析,若计算的 F 值小于 F 临界值(显著性水平 $\alpha=0.05$),则表明样品内和样品间差异无统计学意义,样品是均匀的。稳定性检测采用 t 检验(平均值与参考值的比较);质控物 NAG 和 UMA 两个项目在 3、6、9、12 个月检测的均值与即刻检测的均值比较,若计算出的 $t < t_{0.05(29)}$,表明保存后自制质控物检测的各均值与即

^{*} 基金项目:2012 年深圳市宝安区科技计划项目(2012135)。 作者简介:袁咏梅,女,副主任医师,主要从事临床生物化学与检验研究。

刻检测的均值之间差异无统计学意义。

2 结 果

2.1 均一性实验 尿 NAG 的测试,见表 1。尿 UMA 的测试,总平均值为 44.0 mg/L,总平均值为 47.83 U/L,见表 2。单因子方差分析,查得 F 临界值 $F_{0.05(9,10)}=3.02$,计算的 F 值分别为 2.32 和 1.54,均小于 F 临界值。尿 NAG 与 UMA 测试。

表 1 尿 NAG 的测试结果(U/L)

样本号	检测次数 1	检测次数 2
1	48.78	48.39
2	47.75	48.06
3	46.08	47.15
4	47.77	47.74
5	48.73	47.72
6	46.74	47.75
7	48.79	49.68
8	47.72	46.69
9	45.79	47.76
10	47.75	49.76

表 2 尿 UMA 的测试结果(mg/L)

样本号	检测次数 1	检测次数 2
1	45.2	44.9
2	44.2	43.8
3	42.9	44.0
4	43.9	42.8
5	43.8	43.2
6	43.9	44.8
7	43.7	44.7
8	43.8	45.3
9	43.8	43.9
10	43.9	44.2

2.2 稳定性实验结果 尿 NAG 稳定性检测结果分析,见表 3。尿 UMA 稳定性检测结果分析,见表 4。查 t 界值表 $t_{0.05(29)}=1.699$ 。质控物 NAG 和 UMA 两个项目保存 3、6、9、12 月检测的均值与即刻检测的均值比较,计算出的 t 值均小于 $t_{0.05(29)}$,这表明自制质控物 NAG 和 UMA 两个项目 3、6、9、12 个月检测的均值与即刻检测的均值之间比较,差异无统计学意义。

表 3 尿 NAG 稳定性检测结果分析表

保存时间/温度	均值(U/L)	n	s	t
即刻/室温	47.78	60	2.692	—
3 月/−20 ℃	48.51	30	2.489	1.606
6 月/−20 ℃	47.37	30	2.146	1.046
9 月/−80 ℃	46.96	30	2.857	1.572
12 月/−80 ℃	46.95	30	2.866	1.586

表 4 尿 UMA 稳定性检测结果分析表

保存时间/温度	均值(U/L)	n	s	t
即刻/室温	44.0	60	2.58	—
3 个月(−20 ℃)	44.7	30	2.48	1.546
6 个月(−20 ℃)	43.2	30	2.94	1.490
9 个月(−80 ℃)	44.9	30	2.99	1.649
12 个月(−80 ℃)	43.4	30	2.68	1.226

—:无数据。

3 讨 论

尿液 NAG、UMA 与血肌酐、胱抑素 C 及视黄醇结合蛋白(RBP)等多项联合检测,对早期糖尿病肾损害、高血压早期肾损、妊娠高血压、窒息新生儿早期肾损的早期诊断提供可靠的诊断依据^[8-11]。尿 NAG 和尿 UMA 在临床辅助诊断中具有如此重要的作用,其检测结果的准确性就越发重要。目前,像尿 NAG 和 UMA 等非常规检测项目的室内质控物,因为研制过程较烦琐,耗费时间较长,购买群相对较低,市面上难以找到合适的室内质控物,所以导致这部分检测项目无法实施室内质控,造成实验室质量监控中的空白。本研究旨在研制出一种包含尿 NAG 和尿 UMA 两项复合室内质控物,该质控物应该具备良好的均一性,在一定的保存温度及时间内应具备良好的稳定性。本次研制质控物的材质选自临床肾病患者尿液,如何维持质控物稳定是此次研究的关键。维持质控物稳定性的一个重要手段就是除菌,装载质控物的容器均经过灭菌处理,收集的标本经 0.22 μm 滤膜过滤除菌,加入添加物等均采用无菌操作在生物安全柜中进行。本实验室之前已经建立的一套用于质控物稳定性测试的程序^[4]。在此基础上,参考中国合格评定国家认可委员会的文件稳定性评价“5.2.1 测量平均值与参考值的比较”方法对自制的质控物进行评价及数据的统计分析^[6]。研制的质控物 NAG 和 UMA 两个项目保存 3、6、9、12 个月检测的均值与即刻检测的均值比较无明显性差异,即稳定性良好。本实验为保证质控物的均匀性符合要求,分装前对质控物进行充分混匀;并对于均一性检测采用 ANNOV 方式^[12],ANNOV 方式是抽取有代表性的样本数,每瓶重复测量 2~3 次;均一性检验必须考虑测量的方法、抽样方法、抽样数量、取样量、测量顺序等对结果的影响,以及测量结果的数据分析。对检测结果进行统计学分析,单因素方差分析结果表明质控物瓶间无差异,均匀性良好。本实验研制的尿液 2 项复合室内质控物的均匀性和稳定性评价显示,其在 −20 ℃、−80 ℃温度保存下具备较好的均一性,能在大于 365 天的时间保持稳定,该自制质控物能满足室内质量控制的要求。

参考文献

[1] 明德松,邱晓东.过敏原检测的光化学灭活病毒液态质控物的制备及稳定性观察[J].国际检验医学杂志,2011,32(1):1035,1038.

[2] 陈顺仪,王伟涛.利用新鲜全血标本制作糖化血红蛋白室内质控物的初步应用[J].国际医药卫生导报,2012,18(1):79-82.

[3] 苏炳男,李臣宾,彭明婷.造血干细胞计数全血质控物的研制与评价[J].实用医院临床杂志,2012,9(3):15-18.

[4] 刘和录,许瑞娜,余素燕,等.5 种定性试验质控(下转第 1989 页)

抑制其它细菌,只有脑膜炎奈瑟菌、淋病奈瑟菌和阴道加特纳菌三种菌在 SPS 周围有抑菌环,而脑膜炎奈瑟菌、淋病奈瑟菌对万古霉素耐药,它们在万古霉素周围没有抑菌环,这样在 SPS 和万古霉素 2 个药片周围都有抑菌环的就只有阴道加特纳菌了。这样用 2 个药敏纸片就能将阴道加特纳菌鉴定出来,既简便又经济;而仪器法是利用阴道加特纳菌的生化反应来鉴定的,如果遇到有的细菌的生化反应与阴道加特纳菌的生化反应相似,或阴道加特纳菌的生化反应不明显,就必须补充手工生化反应来鉴别,既繁琐成本又高,故用聚茴香脑磺酸钠 (SPS) 和万古霉素两个药敏纸片的简便方法来鉴定阴道加特纳菌应是一个很好的方法。有很多细菌都是用药敏纸片来鉴定的,如用于肺炎链球菌鉴定用奥普托欣 (Optochin) 纸片,用于化脓性链球菌鉴定用杆菌肽 (Bacitracin) 纸片,用于腐生葡萄球菌鉴定用新生霉素 (Novobiocin) 纸片。

在实际工作中,研究者都会在接种宫颈分泌物后,用宫颈分泌物标本直接涂片革兰染色,这样有一个好处,就是对后面的阴道加特纳菌的鉴定有一个提示作用,因为用标本直接涂片革兰染色,可以发现线索细胞和革兰染色不定的多形性杆菌,可提示可能有阴道加特纳菌的存在;而且在细菌长出后,如果是阴道加特纳菌,它的菌落形态和革兰染色涂片也很有特征,就是针尖大小、圆形、光滑、半透明、形似露滴状的菌落,它和奈瑟菌的形态差别很大,而且涂片革兰染色的镜下形态也完全不同,所以应重视原始标本的涂片,它对研究者的后续鉴定很有帮助。但不是所有的阴道加特纳菌都会发现线索细胞,阴道加特纳菌分 2 个生物型,一个是黏附型,一个是分散型^[9],如果是黏附型,则很容易见到线索细胞;如果是分散型,则见不到线索细胞,但这不影响研究者鉴定,因为还有菌落形态和细菌涂片革兰染色给研究者的提示。

临床采集宫颈分泌物标本时,有可能会碰到阴道壁,这时标本类型已经发生了变化,从“无菌部位”的宫颈分泌物标本 (ECS) 变成了有正常菌群生长的高位阴道拭子 (HVS),阴道加特纳菌有可能就成为一种共生菌,就要分几种情况进行处理:一种情况是从生长情况看,只有少量阴道加特纳菌,不是优势

菌群,则不需要鉴定;另一种情况是从生长情况看,阴道加特纳菌很多,明显是优势菌群,则需要鉴定^[10]。对于生殖道的阴道加特纳菌,是不需要做常规药敏的,如果有需要,灭滴灵是一种可选择的治疗药物^[10]。这就需要微生物检验人员平时多总结经验,努力提高业务水平。总之,希望这种简便又经济的鉴定阴道加特纳菌的方法能给大家带来一些帮助。

参考文献

[1] Van Belkum A, Koeken A, Vandamme P, et al. Development of a species-specific polymerase chain reaction assay for *Gardnerella vaginalis* [J]. *Mol Cell Probes*, 1995, 9(3): 167-174.

[2] Mendoza- Gonzalez A, Sanchez-Vega JT, Sanchez Peon I, et al. Frequency of *Gardnerella vaginalis* vaginosis and its association with other pathogens causing genital infections in the female [J]. *Ginecol Obstet Mex*, 2001, 69(7): 272-276.

[3] 周庭银. 临床微生物诊断与图解 [M]. 3 版. 上海: 上海科学技术出版社, 2012, 5-7.

[4] 丛玉隆, 尹一兵, 陈瑜. 检验医学高级教程 [M]. 北京: 人民军医出版社, 2011, 906-910.

[5] 周庭银. 临床微生物诊断与图解 [M]. 3 版. 上海: 上海科学技术出版社, 2012, 289-290.

[6] Murry PR, Barn EJ, Jorgensen JH, et al. Manual of clinical microbiology [M]. 10th ed. Washington: ASM Press, 2011.

[7] 叶应妩, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程 [M]. 3 版. 南京: 东南大学出版社, 2006: 738-739.

[8] 陈建国. 药理学 [M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 2007: 318-319.

[9] Alexander S, Yvonne D, Vera LB, et al. *Gardnerella* biofilm involves females and males and ss transmitted sexually [J]. *Gynecol & Obst invest*, 2010, 70(4), 256-263.

[10] Isenberg HD. Clinical microbiology procedure handbook [M]. 7th ed. Washington: ASM Press, 2007, 370-378.

(收稿日期: 2013-03-28)

(上接第 1987 页)

物的研制与应用 [J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(5): 589-590.

[5] 李臣宾, 彭明婷, 苏炳男, 等. 非牛顿流体血液黏度质控物的研制 [J]. 现代检验医学杂志, 2010, 25(6): 153-155.

[6] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS-GLO3 能力验证样品均匀性和稳定性评价指南 [S]. 北京: 中国合格评定国家认可委员会, 2006.

[7] International Organization for Standardization. ISO Guide 35: 2005 certification of reference material-general and statistical principles [S]. Geneva, Switzerland; International Organization for Standardization, 2005.

[8] 刘光华. 尿 NAG、血 SCr 对早期糖尿病肾病的诊断价值 [J]. 中国当代医药, 2012, 19(15): 79-81.

[9] 王巍巍, 刘艳芳. 尿生化指标检测在肾功能早期改变中的诊断价值 [J]. 实用预防医学, 2012, 19(4): 601-603.

[10] 陆小梅, 黎四平, 邹建铭. 联合检测尿微量清蛋白、转铁蛋白和 α -微球蛋白在窒息新生儿早期肾损伤的应用价值 [J]. 中国实验诊断学, 2012, 16(3): 436-438.

[11] 刘敏. 血清清蛋白、尿微量清蛋白在妊娠征患者中表达和临床诊断意义 [J]. 中国实验诊断学, 2012, 16(1): 93-94.

[12] International Organization for Standardization. ISO 15189: quality management in the medical laboratory [S]. Geneva, Switzerland; International Organization for Standardization, 2003.

(收稿日期: 2013-03-05)