

· 临床检验研究论著 ·

国产邻苯三酚红试剂检测尿蛋白的性能验证*

曾雅琦, 陈 特, 毕小云

(重庆医科大学附属第一医院检验科, 重庆 400016)

摘要:目的 评估国产邻苯三酚红试剂测定尿蛋白的分析性能。方法 收集不同尿液蛋白浓度的新鲜尿液标本, 采用不精密度、回收率、最低检出限、线性范围以及临床可报告范围进行验证。结果 高、低 2 个浓度水平尿液样本总蛋白测定的批内 CV 值分别为 2.34% 及 1.11%, 批间 CV 值分别为 3.21% 及 1.65%; 平均回收率为 97.5%, 最低检出限为 0.367 mg/dL, 在 11~298 mg/dL 的浓度范围内线性良好, 最大稀释倍数为 20 倍, 临床可报告范围为 11~5 960 mg/dL。结论 不精密度、回收率指标可满足临床要求, 最低检出限、线性范围、最大稀释倍数及临床可报告范围可提供更好的质量保证, 但高浓度标本需稀释处理。

关键词:尿; 蛋白; 邻苯三酚红; 性能验证; 自动生化分析仪

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.21.022

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)21-2840-02

Performance verification of domestic pyrogallol red reagent in urine protein detection*

Zeng Yaqi, Chen Te, Bi Xiaoyun

(Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To evaluate the analytical performance of domestic pyrogallol red reagent in urine protein detection. Methods Fresh urine samples of different urine protein concentration were selected. Non-precision, recovery rate, minimum detectability, linear range and clinical reportable range were adopted for verification. Results Intra-assay CV values of total protein detection of urine samples in highest and lowest concentration levels were 2.34% and 1.11%, respectively, and inter-assay CV values of those were 3.21% and 1.65%, respectively. The average recovery rate was 97.5% and the minimum detectability was 0.367 mg/dL. Good linearity was found in the concentration range of 11–298 mg/dL and the maximum dilution ratio was 20. The clinical reportable range was 11–5 960 mg/dL. Conclusion Non-precision and recovery rate may meet the clinical requirements. The minimum detectability, linear range, maximum dilution ratio and clinical reportable range can provide better quality guarantee, however, the samples of high concentration need to be diluted.

Key words: urine; protein; pyrogallol red; performance verification; automatic biochemical analyzer

蛋白尿是评价肾脏疾病的一个重要指标。在肾脏病变早期, 虽然尿常规检测提示为蛋白阴性, 但是尿液实际已含有微量蛋白。因此, 收集 24 h 尿液进行尿蛋白分泌量测定是尿蛋白测定的“金标准”。通常健康人 24 h 尿蛋白不应超过 150 mg。但是, 尿液中的蛋白成分比较复杂, 还有诸如盐类结晶、代谢产物以及色素等多因素的干扰, 因此, 对尿液总蛋白的检测试剂具有较高的要求^[1]。定量检测尿蛋白的试剂早先均为进口试剂, 成本较高, 随着国内试剂研发能力的加强, 国产尿蛋白检测试剂性能已有明显提高, 现参照文献^[2-5]报道的方法, 对国产尿液总蛋白试剂进行性能验证, 报道如下。

1 材料与与方法

1.1 样品来源 尿液标本分别取自正常人和肾脏疾病患者, 按要求留取 24 h 尿液或随机收集, 排除乳糜尿、血尿、结晶尿及药物的影响。尿液标本采集后于 4 ℃ 冰箱储存, 用于重复测定。

1.2 主要试剂与仪器 尿蛋白测定试剂由宁波美康生物科技有限公司提供, 批号: 20120625, 内含校准品, 校准品批号: 20120626。质控品由美国强生公司提供, 批号: C1730。主要仪器为 HITACHI 7600-110 全自动生化分析仪(日本)。

1.3 检测方法及其原理 检测采用邻苯三酚红钼络合显色法(pyrogallol red molybdate complex, PRM)法, 其测定原理为邻苯三酚红与钼酸结合形成红色复合物, 此复合物在酸性条件下

与蛋白结合形成蓝紫色复合物, 可在特定的波长处测定吸光度的变化, 由此可计算出尿液总蛋白的含量。

1.3.1 精密度验证 批内精密度: 选择高、低 2 个水平的尿液, 测定 20 次, 计算平均值、标准偏差(standard deviation, SD)、批内变异系数(coefficient of variation, CV)(%)。批间精密度: 选择高、低 2 个水平的尿液, 连续测定 20 d, 计算均值、SD、批间 CV(%)。依据 1988 年美国临床实验室改进修正案(Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988, CLIA'88)能力验证计划的分析质量要求中规定允许总误差(allowed total errors, TEa)的 1/4 为批内不精密度判断低限, 1/3 TEa 为批间不精度判断低限, 即批内 $CV \leq 2.5\%$, 批间 $CV \leq 3.3\%$ 。

1.3.2 准确度验证 选取 5 个尿样(蛋白的含量在试剂标示的线性范围内), 每个尿样制成 2 个测试样本(对照、回收)。每个测试样本均检测 2 次。对照样本用 0.9 mL 尿样及 0.1 mL 生理盐水制成; 回收样本用 0.9 mL 尿样及 0.1 mL 的 716 mg/dL 蛋白标准品混合制成, 见表 1。计算每个样本总蛋白的增加量及回收率。以小于卫生部室间质量评价标准可接受范围(靶值 $\pm 10\%$)为判断限。

1.3.3 最低检出限验证 用去离子水作空白样本, 测定重复 10 次, 用获得的空白值(Xbl)、SD 来估计检出限(XL)。计算检出限为: $XL = Xbl + k \cdot SD$, 其中, k 值为 3。

* 基金项目: 国家临床重点专科建设项目经费资助[财社 2010(305)]。 作者简介: 曾雅琦(1982~), 女, 技师, 主要从临床生化检验工作。

1.3.4 线性验证 选取新鲜高值尿样(H)和低值尿样(L)各一份,将 H 和 L 按 L、H+4×L、2×H+3×L、3×H+2×L、4×H+L、H 的比例关系各自配制混合,形成系列样品,每份样品重复测定 3 次,计算平均值。以理论值为 X,实测值的均值为 Y,计算回归方程。依据试剂盒说明书得到尿总蛋白检测的线性范围为 0~300 mg/dL,要求在线性范围内: $R^2 > 0.95$, b 为 0.97~1.03。

表 1 回收实验样本准备 (mg/dL)

序号	对照样本		回收样本	
	结果 1	结果 2	结果 1	结果 2
1	27.00	30.00	101.00	101.00
2	69.00	67.00	137.00	140.00
3	230.00	233.00	298.00	296.00
4	212.00	212.00	288.00	286.00
5	133.00	131.00	200.00	195.00

1.3.5 临床可报告范围验证 选择在尿总蛋白检测的线性范围内的高浓度样本 5 份,用去离子水分别作 2、5、10、20、30 倍稀释,检测结果与稀释后的预期值进行比较,计算稀释回收率,以稀释回收率在 90%~110%为可接受的判断标准,从而确定最大稀释倍数;结合线性范围以确定临床可报告范围。

2 结 果

2.1 精密度验证 在高、低 2 个浓度水平尿液样本总蛋白测定的批内 CV 均小于 1/4 TEa,批间 CV 均小于 1/3 TEa,检测系统精密度可接受,见表 2、3。

表 2 高、低值尿液样本总蛋白测定的批内精密度验证 (mg/dL)

样本	平均值	最大值	最小值	SD	CV
低值样本	86.90	93.00	85.00	2.03	2.34%
高值样本	277.20	284.00	270.00	3.09	1.11%

表 3 高、低值尿液样本总蛋白测定的批间精密度验证 (mg/dL)

样本	平均值	最大值	最小值	SD	CV
低值样本	65.60	73.00	63.00	2.11	3.21%
高值样本	161.70	165.00	159.00	2.68	1.65%

2.2 准确度验证 准确度验证提示尿液样本总蛋白平均回收率为 97.5%,符合卫生部室间质量评价标准的可接受范围(靶值±10%),说明本检测系统的准确度可以接受,见表 4。

表 4 尿蛋白测定的准确度验证

序号	对照样本	回收样本	SD (mg/dL)	加入量 (mg/dL)	回收率 (%)
	平均值 (mg/dL)	平均值 (mg/dL)			
1	28.50	101.00	72.50	71.60	101.30
2	68.00	138.50	70.50	71.60	98.50
3	231.50	297.00	65.50	71.60	91.50
4	212.00	287.00	75.00	71.60	104.70
5	132.00	197.50	65.50	71.60	91.50

2.3 最低检出限验证 最低检出限验证提示尿液样本总蛋白的最低检出限为 0.367 mg/dL,见表 5。

表 5 尿蛋白测定的最低检出限验证 (mg/dL)

检测次数	检测结果	检测次数	检测结果
第 1 次	0.00	第 8 次	0.00
第 2 次	0.00	第 9 次	0.00
第 3 次	-1.00	第 10 次	-1.00
第 4 次	-1.00	均值	-2.00
第 5 次	1.00	标准差	0.79
第 6 次	1.00	检测下限	0.37
第 7 次	-1.00	—	—

—:此项目无数据。

2.4 线性验证 本系统尿液总蛋白测定在 11~298 mg/dL 的浓度范围内呈线性,回归方程及相关系数的平方如下: $Y = 0.9946X + 6.0904$, $R^2 = 0.9969$ 。见图 1。

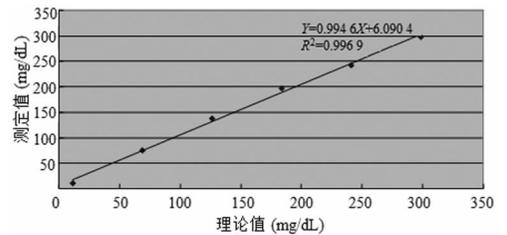


图 1 尿蛋白测定的线性分析

2.5 临床可报告范围验证 5 份样本的最大稀释倍数为 20 倍,结合线性范围,本检测系统的临床可报告范围为 11~5 960 mg/dL。

3 讨 论

尿液总蛋白测定是临床检测早期肾小球肾炎、糖尿病、高血压所致肾病的最常用指标^[6]。但是不同的检测方法,其结果具有较大的差异,传统的磺基水杨酸测定尿蛋白结果较 PRM 法低^[7-8],操作简单,灵敏度高,可检出低于 5 mg/dL 的蛋白质^[9],但易出现极微量的蛋白,无临床意义,其判断结果时间也要严格控制在 1 min 内,否则可使反应强度升级,且含有某些药物(超大剂量青霉素、有机碘造影剂)或代谢产物(高浓度尿酸或尿酸盐)的标本可导致该检测法出现假阳性^[10];由于蛋白沉淀物容易粘附比色杯,因此,该法也不适合在生化分析仪上进行自动化测定。而 PRM 法测定尿蛋白则具有一定的稳定性,且能在全自动分析仪上进行检测,而国产试剂的检测性能近年来也有了明显提高^[11]。

本研究表明,国产试剂盒测定结果的精密度和准确性均较好,其中,低浓度水平的重复性比高浓度的稍差,但 CV 值仍在可接受范围,所产生的误差较小,不会对临床诊断和治疗带来明显影响。在批间检测的 20 d 内,未对试剂进行更换,说明该试剂的稳定性较好。本系统尿液总蛋白测定在 11~298 mg/dL 浓度范围内呈线性,与文献报道基本一致^[12-13],因线性范围较窄,在实际操作中要注意高浓度标本的稀释,并且选择合适的稀释倍数,本文验证该系统的最佳稀释倍数为 20 倍,临床可报告范围为 11~5 960 mg/dL,能够满足临床需要。

尿蛋白的测定对肾脏疾病的诊断和治疗具有重要作用^[14],采用 PRM 法检测能直接采用自动化分析仪进行操作,提高了尿蛋白测定的精密度和准确性且能排(下转第 2843 页)

表 2 DFA 与 IFA 检测结果的敏感性和特异性比较

组别	检测阳性 (n)	确诊阳性 (n)	假阳性 (n)	敏感性 (%)	特异性 (%)
DFA	36	35	1	54.6	97.2
IFA	56	27	9	87.5	48.2

3 讨 论

大规模流感病毒亚型的快速准确鉴定,对于流感的防治和疫情的控制尤为重要。目前,国内诊断呼吸道感染基本采用电镜检测、培养鉴定法、聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)、酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)、IFA、凝集法等,有文献指出以上这些方法中,抗原较抗体检测更敏感^[6-7]。以往检测主要采用 IFA 法^[8],目前临床多利用抗原与特异性抗体形成特异性免疫复合物,用 IFA 来鉴定流感病毒亚型,该法形成的复合物可比 DFA 法更多地连接荧光抗体,故较 IFA 法灵敏^[9-10]。

本研究所需标本取自某学校大规模流感流行的腺病毒感染者,实验结果显示,患者采用 DFA 法检测出阳性 32 例,IFA 法检测出阳性 43 例,二者阳性率的差异无统计学意义($P > 0.05$)。IFA 法较 DFA 法检测更敏感。此外,IFA 法还检出 3 例乙型流感病毒抗体,2 例甲型流感病毒抗体。两种方法的敏感性和差异性比较,差异无统计学意义($P < 0.01$)。运用 DFA 法同时检测 7 种常见的呼吸道病毒^[11],能及时为临床提供病原学资料,在指导合理用药方面具有重要的意义^[12-15]。IFA 法检测呼吸道病毒具有高灵敏性和特异性,而且操作简便,适合临床实验室病毒检测的要求。

参考文献

[1] 方峰. 加强对病毒感染的研究[J]. 中华儿科杂志, 1998, 36(11): 643-644.

(上接第 2841 页)

除样本中一些干扰物质的影响。本验证显示在应用自动化分析仪检测尿蛋白时,国产试剂的各项检测指标均较为满意。

参考文献

[1] 陆怡德,杨帆,董丹凤,等. 氨基糖苷类药物对尿液总蛋白检测的干扰分析[J]. 检验医学, 2012, 27(5): 336-339.
 [2] 徐国宾,蒋琳. 临床生物化学常规定量方法的分析性能评价[J]. 中华检验医学杂志, 2007, 30(6): 718-720.
 [3] 王治国. 临床检验方法确认与性能验证[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 240-244.
 [4] 李萍,姜悦,王惠民,等. 临床实验室管理学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2006: 38-40.
 [5] 张秀明,庄俊华,郑松柏,等. 临床化学发光免疫法检测 AFP 的分析性能验证与实验方法[J]. 中华检验医学杂志, 2007, 30(11): 1293-1297.
 [6] 李岱容,黄维嘉,程大林,等. 邻苯三酚红法定量测定尿蛋白[J]. 江西医学检验, 2002, 20(4): 197-198.
 [7] Marshall T, Williams KM. Total protein determination in urine: elimination of a differential response between the coomassie blue

[2] 莫运波,何扬帆,杨炳中. 儿童急性呼吸道感染 256 例病毒检测分析[J]. 中国实用儿科杂志, 2008, 23(4): 295-297.
 [3] 孙蒂,林宏,王厚芳,等. 呼吸道系统感染性疾病快速实验室诊断技术的应用[J]. 检验医师, 2003, 2(1): 3-6.
 [4] 黄凌,安邦权,周燕明,等. 直接免疫荧光法对七种呼吸道病毒检测的临床应用[J]. 贵州医药, 2009, 33(5): 422-423.
 [5] 陶国华,郭新荣,吴俊渊. 541 例呼吸道病毒和病毒抗体检测分析[J]. 标记免疫分析与临床, 2000, 7(1): 19-20.
 [6] 顾伟中,曹群,汤宏峰,等. 直接免疫荧光法对呼吸道分泌物多种呼吸道病毒检测的临床意义[J]. 实用儿科临床杂志, 2004, 19(10): 857-858.
 [7] 朱汝南,邓洁,王芳,等. 2000 年秋冬季至 2002 年夏北京地区呼吸道感染的病毒病原学研究[J]. 临床儿科杂志, 2003, 21(1): 25-26.
 [8] 徐放生,吴婉芳,王秀芳,等. 新生儿肺炎病原体学及临床研究[J]. 中华儿科杂志, 1998, 36(10): 601-603.
 [9] 申昆玲,买颖,刘亚谊,等. 免疫荧光法检测鼻咽物中多种呼吸道病毒抗原[J]. 中华儿科杂志, 1999, 37(7): 401-403.
 [10] 周长江. 呼吸道合胞病毒感染流行病学研究[J]. 实用儿科临床杂志, 2002, 17(4): 425-426.
 [11] 李海珠,吕波,林志方,等. 小儿下呼吸道感染病原体检测与临床分析[J]. 中华检验医学杂志, 2006, 29(5): 433-434.
 [12] 周晓聪,徐强,董琳,等. 儿童呼吸道感染谱临床分析[J]. 浙江医学杂志, 2006, 28(4): 293-294.
 [13] 张梓荆. 小儿病毒性呼吸道感染与病毒性肺炎[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1990.
 [14] 王同权,何亚香,季正华,等. 快速检测小儿肺炎病毒病原体 1615 例报告[J]. 苏州医学院学报, 1995, 15(1): 153-154.
 [15] 孙志勤,周建发,张丹,等. 武汉地区 1978 至 1993 年间小儿呼吸道感染实验研究及流行病学分析[J]. 中国实用儿科杂志, 1994, 9(1): 42-43.

(收稿日期: 2013-09-14)

and pyrogallol red protein dye-binding assays[J]. Clin Chem, 2000, 46(3): 392-398.

[8] 胡望平,胡盈莹,陈金花. 用邻苯三酚红钼络合法测定尿液及脑脊液蛋白[J]. 上海医学检验杂志. 2003, 18(6): 340-342.
 [9] 赵桂芝,王淑娟,江忠仪,等. 临床检验学[M]. 3 版. 成都: 四川科学技术出版社, 1997: 226-227.
 [10] 安崇文,李海霞. 连苯三酚红法测定尿液及脑脊液蛋白的再认识[J]. 中国药事, 2012, 26(6): 566-571.
 [11] 刘红彬. 24 小时尿液总蛋白测定及其临床意义的再认识[J]. 中国医疗前沿, 2009, 4(20): 70-71.
 [12] 陈筱菲,池胜英,刘存丽,等. 尿总蛋白测定情况调查和邻苯三酚红钼法评价[J]. 温州医学院学报, 2004, 34(5): 369-370.
 [13] 黄芳. 连苯三酚红法测定尿蛋白的方法学评价[J]. 现代中西医结合杂志, 2007, 16(4): 507-508.
 [14] 邵天波,郭翀,杨兰辉,等. 24 h 尿蛋白和尿 NAG 与尿蛋白/肌酐比值及尿 NAG/肌酐比值的相关性研究[J]. 检验医学, 2010, 25(5): 385-386.

(收稿日期: 2013-06-07)