

前清蛋白定量检测限和功能灵敏度的评价及临床应用^{*}

万泽民¹, 张秀娟², 李磊³, 王云秀¹, 吴晓宾¹, 陈炜烨¹, 张成¹, 王建兵¹, 柯培锋¹

(1. 广东省中医院检验科, 广东广州 510120; 2. 广东省中医院大学城医院肝病科, 广东广州 510120;
3. 广州医科大学附属第三医院检验科, 广东广州 510120)

摘要:目的 对 Roche Modular P 全自动生化分析仪检测前清蛋白(PA)的空白限(LoB)、检测限(LoD)、定量检测限(LoQ)以及功能灵敏度(FS)进行评价。方法 参照美国临床和实验室标准化协会(CLSI)EP-17A 文件, 将空白样品生理盐水及系列低浓度样品在 Roche Modular P 全自动生化分析仪上进行检测确定该方法的空白限、检出限和定量检测限。依据国内通用方法确定功能灵敏度。结果 PA 的空白限为 16.35 mg/L, 检测限为 18.23 mg/L, 定量检测限暂无法评价, 功能灵敏度为 25.00 mg/L。结合其可报告范围的低值, 确定其临床的报告范围及报告方式。结论 建立了 PA 在 Roche Modular P 全自动生化分析仪上检测的定量检测限, 为临床诊断和治疗提供了更有价值的信息, 对不同评价的方法进行比较, 明确了不同方法实际应用的优点以及局限性。

关键词:前清蛋白; 免疫散射比浊法; 空白限; 检测限; 功能灵敏度

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.14.039

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)14-1908-03

Evaluation of quantitative detection limit and functional sensitivity of prealbumin and their clinical applications analysis

Wan Zemin¹, Zhang Xiujuan², Li Lei³, Wang Yunxiu¹, Wu Xiaobin¹,

Chen Weiye¹, Zhang Cheng¹, Wang Jianbing¹, Ke Peifeng¹

(1. Department of Clinical Laboratory, TCM Hospital of Guangdong, Guangzhou, Guangdong 510120, China;

2. Department of Liver Diseases, University City Hospital of TCM Hospital of Guangdong,

Guangzhou, Guangdong 510120, China; 3. Department of Clinical Laboratory, the Third

Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510120, China)

Abstract:Objective To evaluate the limit of blank (LoB), limit of detection (LoD), limit of quantitation (LoQ) and functional sensitivity (FS) of prealbumin (PA) detected by the Roche Modular P automatic biochemical analyzer. **Methods** According to the EP17A file of the American Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), saline as the blank sample and a series of low concentration samples were detected by the Roche Modular P automatic biochemical analyzer for determining LoB, LoD and LoQ. And FS was determined based on the domestic universal method. **Results** LoB of PA was 16.35 mg/L, LoD was 18.23 mg/L, LoQ was temporarily unable to evaluate and FS was 25.00 mg/L. The report scope and the report mode in clinic were affirmed by combining with the low value of the reportable scope. **Conclusion** LoD of PA detected by the Roche Modular P automatic biochemical analyzer is established, which provides more valuable information for clinical diagnosis and treatment. Conducting the comparison of different evaluation methods determines the advantages and limitation of the practical application of different methods.

Key words: prealbumin; immune nephelometry; limit of blank; limit of detection; functional sensitivity

前清蛋白(PA)由肝细胞合成, 因其电泳速度较清蛋白快而得名。PA 的体内半衰期为 1.9 d, 而清蛋白为 21 d, 所以 PA 能够更加快速的反应肝细胞的合成能力^[1-2]。有文献[3-7]报道, PA 能更灵敏地反映肝细胞受损的严重程度, 肝细胞受损越严重, 肝细胞合成能力越低, PA 水平降低的越多。实际应用中, 病情严重的患者的血清 PA 降低幅度大, 经常会达到厂商声明的检测低限, 所以有必要建立本实验室的定量检测限或功能灵敏度。本研究参照 EP-17A 文件以及国内通用方法, 结合实验室制定的质量目标, 对 PA 的定量检测限和功能灵敏度进行了评价, 旨在为临床提供更加真实可靠的数据。

1 资料与方法

1.1 仪器与试剂 仪器采用 Roche 公司的 Roche modular P 大型生化分析仪, 试剂为上海科华生物工程股份有限公司的前清蛋白(PA)测定试剂盒(批号: 2013121B), 校准品(批号: 2013121B)与试剂盒配套提供, 质控品(批号: 45642、45643)为伯乐公司的第三方质控物。

1.2 方法

1.2.1 按试剂说明书提供的校准周期进行校准, 每天运行 2 次质控, 质控在控后方可检测样品。

1.2.2 空白限(LoB)的确定 因无法得到 PA 为 0 mg/L 的血清样本, 研究者用生理盐水作为空白样本, 每天检测 2 批, 每批 6 次, 持续 5 d, 共 60 个数据。所得数据进行正态性检验, 数据符合正态分布, $LoB = \mu_B + 1.645\sigma_B$, 按 $\alpha = \beta = 5\%$, 其中 α 代表 I 类错误/假阳性, β 代表 II 类错误/假阴性, 式中 μ_B 代表空白检测的均数, σ_B 代表空白检测的标准差; 数据不符合正态分布, 采用非参数检验, 将空白样品的结果的由小到大排列, 第 95% 数值即为 LoB。

1.2.3 检出限(LoD)的确定 取 PA 标示含量为 35 mg/L 的校准品 6 支, 该校准品基质为健康人血清, 定值可溯源至 CRM470。6 支标准品每天检测 2 次, 连续 5 d, 共 60 个数据。若数据呈正态分布, 则 $LoD_{ST} = LoB + C_\beta SD_s$, $C_\beta = 1.645/[1 - 1(4 \times f)]$, 其中 C_β 是纠正因子, f 是估计标准差 SD_s 的自由

^{*} 基金项目: 广东省中医院拔尖人才专项(2011KT647)。 作者简介: 万泽民, 男, 检验技师, 主要研究领域为临床生化检验及质量控制。

[△] 通讯作者, E-mail: 13760673961@163.com。

度。 SD_s 是低水平样本精密度的综合估计值,即 $SD_s^2 = (n_1SD_{s1}^2 + n_2SD_{s2}^2 + \cdots + n_nSD_{sn}^2)/(n_1 + n_2 + \cdots + n_n)$,其中 $n_n = N_n - 1, N_1, N_2, \cdots, N_n$ 为各个样本的重复检测数;若数据呈非正态分布, $LoD = LoB + D_s\beta$ 。其中 $D_s\beta$ 是低浓度样本测定值中位数的值与低浓度样本的第 5% 数值的间距。

1.2.4 定量检测限(LoQ)的确定 计算各支校准品实测值均值与预期值 35 mg/L 的偏倚以及总误差(TE),其中总误差(TE)=平均偏倚+2SD_s,60 个低浓度校准品测量值的综合估计值 SD_E ,其计算方式按 1.2.3 所述。若 TE 小于实验室制定的质量目标 25%,则 $LoQ = LoD$;若 TE 大于实验室制定的质量目标 25%,则需要选择更高浓度的定值标本重复检测。

1.2.5 功能灵敏度(FS)的确定 将 PA 水平约为 15 mg/L 和 60 mg/L 的患者血清标本按比例混合成 6 个浓度,每个浓度每天检测 2 次,连续检测 5 d,共 60 个数据。统计各浓度的平均值和标准差,计算 CV 值。CV 值小于 20% 时所对应的浓度即为 PA 的功能灵敏度。

2 结 果

2.1 PA 的空白检测限(LoB) 60 个空白样本的数据为非正态分布,固采用非参数检验的统计学方法。将数据由小到大排列,根据公式,LoB 为第[NB(95/100)+0.5]位对应的数值,当 NB=60,LoB 即为第 57.5 位数。空白样本检测结果排序后第 40~60 位数见表 1。第 57.5 位数结果为 16.07+(16.63-16.07)×0.5,LoB 即为 16.35 mg/L。

表 1 空白样本检测结果第 46~60 位数	
秩号	检测结果(mg/L)
46	10.15
47	10.76
48	11.14
49	11.83
50	12.44
51	13.15
52	13.47
53	14.37
54	14.53
55	14.85
56	14.90
57	16.07
58	16.63
59	19.22
60	22.87

2.2 PA 的检测限(LoD)及定量检测限(LoQ) 6 支校准品共得到 60 个数据,其检测结果见表 2。该数据不符合正态分布,所以采用非参数检验的方法。 $D_s\beta$ 是低浓度样本测定值中位数的值与低浓度样本的第 5 个百分位数值的间距,利用统计软件计算,其中位数为 27.835,5% 位数为 25.955,则 $D_s\beta = 27.835 - 25.955 = 1.88$ 。 $LoD = LoB + D_s\beta$,即为 18.23 mg/L。综合标准差 $SD_s^2 = (n_1SD_{s1}^2 + n_2SD_{s2}^2 + \cdots + n_6SD_{s6}^2)/(n_1 + n_2 + \cdots + n_6)$,计算得 $SD_s = 3.49$ 。平均偏倚=(5.67+5.37+5.24+5.06+5.04+4.44)/6=5.14。总误差 TE=5.14+2×3.49=12.12。TE 大于实验室制定的质量目标 25%,即 358.75 mg/L,所以 $LoQ \neq LoD$,应采用较高浓度的定值标本再次确定 LoQ。

2.3 PA 的功能灵敏度(FS) 将高值标本和低值标本按比例混合成 6 个浓度,每个浓度检测 10 次,检测结果如表 3。表中,样品 2 的 CV 值为 15.41%,大于 20%,所以确定 PA 的功能灵敏度为 25.00 mg/L。

表 2 低浓度校准品检测结果						
PA (mg/L)	校准品 1	校准品 2	校准品 3	校准品 4	校准品 5	校准品 6
平均值	29.33	29.63	29.76	29.94	29.96	30.56
标准差	2.77	3.24	3.32	3.68	3.94	3.82
偏倚	-5.67	-5.37	-5.24	-5.06	-5.04	-4.44

表 3 患者标本检测结果						
PA	样品 1	样品 2	样品 3	样品 4	样品 5	样品 6
平均值(mg/L)	15.14	25.00	38.43	43.88	50.21	61.78
标准差(mg/L)	3.69	3.85	3.84	3.42	3.47	2.34
CV(%)	24.35	15.41	10.00	7.80	6.91	3.79

3 讨 论

本研究根据美国临床和实验室标准化协会(CLSI)的 EP-17A 文件《检出限和定量检出限确定方案-批准指南》以及国内灵敏度检测通用方法的相关要求,确定了本实验室前清蛋白检测的空白限 LoB 为 16.35 mg/L、检测限 LoD 为 18.23 mg/L 以及功能灵敏度 FS 为 25.00 mg/L。

EP-17A 的评价方法与灵敏度常规评价方法相比,更符合统计学要求,但是实际应用时常常规临床实验室很难达到其部分要求,现将两种方法做一简单比较^[8-10]。见表 4。

表 4 EP-17A 的评价方法与常规评价方法的比较		
指标	EP-17A	常规方法
LoB 与 LLD	至少 60 个空白测定,多天使用检测值,参数或非参数检验方法	10~20 个空白测定,1 d 或多天使用初始值转换成检测值
LoD 与 BLD	参数或非参数检验方法	参数检验方法,尝试法
LoQ 与 FS	TE 大于质量目标时对应的浓度	CV 为 20% 时对应的浓度,尝试法

由表 4 可以看到,EP-17A 文件中 LoB 的测定没有初始值转换的步骤,应用检测值数据更加直观、准确。为避免基质效应的影响,文件建议使用不含标示物的血清标本,这在临床实验室中很难制备,所以研究中选用了生理盐水作为空白。
LoD 的测定采用参数或非参数检验的方法,测量方法基于低浓度样本的综合标准差,而常规方法采用多浓度尝试的方

法,并且没有考虑数据的分布情况,统一使用参数检验的方法有一定的局限性。不过,采用非参数检验的方法确定 LoD 时,样品浓度范围越大,所得到的越大,LoD 也越大。
常规方法测定 FS 时也采用了尝试法,实际工作中很难得到 CV 值正好为 20% 时所对应的浓度。相对地,LoQ 的测定基于总误差,其中还考虑了偏差的存在,其要(下转第 1913 页)

rpoB 基因突变所致^[7], rpoB 基因突变导致 RFP 不能与细菌 RNA 聚合酶 β 亚单位结合, 而出现耐药^[8], rpoB 基因 DNA 微阵列检测 6 个位点、13 个突变型。KatG 基因突变引起过氧化氢酶活性降低, 导致 INH 耐药, inhA 基因突变使 NADH 酶失去了和 NADH 的亲合力, 导致 INH 耐药^[9], KatG 基因、inhA 基因 DNA 微阵列各检测 1 个位点, 分别为 KatG 的 315 位两个突变型, inhA 基因启动子 1 个突变型。DNA 微阵列技术就是一种建立于 PCR 基础上结合高特异性的 DNA 探针来检测上述位点及突变的杂交方法。试验中 DNA 微阵列法对 RFP 的检测结果与比例法的药敏结果复合较好, 灵敏度是 91.0%, 特异性是 100%, 对 INH 的灵敏度是 75.0%, 特异性是 100%, 说明 ropB、katG、inhA 基因作为结核分枝杆菌耐药性快速诊断标志具有很好的代表性。并且 rpoB 的位点突变中, 531、526、516 位的突变最为常见, 微阵列法包含了上述位点及突变, 所以检测 RFP 有较好的敏感性。在对 INH 的检测中, 有 6 株 INH 比例法耐药的菌株, 基因微阵列法未检出, 原因可能是除 KatG、inhA 外, KaSA 和 ahpc 基因也与 INH 的耐药有一定的关系, ahpc 基因突变可导致 ahpc 表达增强, 它的过量表达可以补偿因 KatG 基因突变的损失, 一般将 ahpc 基因作为 KatG 基因损伤的标志。KatG 基因突变除 315 位, 463 位还可见 104Arg, 108His 等密码子突变, 不过也有学者认为 KatG463 密码子是一个多态性位点, 因此其突变与 INH 耐药关系不大。芯片设计中对 INH 的突变检测 KatG 基因只设计了 315 位, 是否因突变位点检测的缺失还有待进一步的检测分析。另外, 尽管分子生物学类技术如 DNA 微阵列有很多优势, 但样本中结核分枝杆菌数目较少或者样本中存在抑制 DNA 扩增的物质等, 也有可能造成假阴性^[10]。

综合看来, DNA 微阵列技术具有快速、灵敏度好、特异性高的特点, 可作为临床快速检测结核分枝杆菌耐药株的筛选试验, 尤其是在耐多药结核病的筛选中具有重要价值。可以为临床诊断、选择和调整耐药结核病的治疗方案提供参考, 在积极应对结核尤其是耐多药结核病, 遏制结核的传播, 降低结核病

的病死率方面有重要意义。

参考文献

- [1] Lnnroth K, Castro KG, Chakaya JM, et al. Tuberculosis control and elimination 2010-50: cure, care, and social development[J]. Lancet, 2010, 375(9728):1814-1829.
- [2] World Health Organization. WHO Report: Global Tuberculosis Control 2012[S]. 2012.
- [3] 中华人民共和国卫生部. 全国结核病耐药性基线调查报告(2007-2008)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010.
- [4] Boehme CC, Nicol MP, Nabeta P, et al. Feasibility, diagnostic accuracy, and effectiveness of decentralized use of the Xpert MTB/RIF test for diagnosis of tuberculosis and multidrug resistance: a multicentre implementation study[J]. Lancet, 2011, 377(9776): 1495-1505.
- [5] Guo Y, Zhou Y, Wang C, et al. Rapid, accurate determination of multidrug resistance in M. tuberculosis isolates and sputum using a biochip system[J]. Int J Tuberc lung Dis, 2009, 13(7):914-920.
- [6] Chaoui I, Sabouni R, Kourout M, et al. Analysis of isoniazid, streptomycin and ethambutol resistance in Mycobacterium tuberculosis isolates from Morocco[J]. J infect Dev Ctries, 2009 3(4):278-284.
- [7] Pham M, Lemberg DA, Day AS. Probiotics: sorting the evidence from the Myths[J]. Med J Aust, 2008, 188(5):304-308.
- [8] Science Direct. Rifampin[J]. Tuberculosis, 2008, 88:151-154.
- [9] Luckner SR, Liu N, am Ende CW, et al. A slow, tight binding inhibitor of InhA, the enoyl-acyl carrier protein reductase from Mycobacterium tuberculosis[J]. J Biol Chem, 2010, 285(19):14330-14337.
- [10] 张太松, 李明. 分子诊断技术在耐多药结核分枝杆菌检测中的应用进展[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2009, 1(2):129-134.

(收稿日期:2014-02-08)

(上接第 1909 页)

求比 FS 的要求更高。但是 LoQ 的确定要求使用低浓度的定值样品, 这样才能估计偏差的大小, 而常规实验室中很难得到定值样品。本研究中 PA 为多点校准, 正好有低浓度的定值校准品 35 mg/L, 但是其计算的 TE 为 12.12 mg/L, 不满足本实验室的要求(25%, 358.75 mg/L), 所以应用浓度稍高的样品确定 LoQ。在测定 FS 时, 将高值标本和低值标本按一定比例混合, 多次测量取均值作为该浓度的标示值, 实验没有考虑稀释效应以及标示值与可接受真值的偏差。本研究中浓度差距稍大, 所以暂定 FS 为 25 mg/L, 其 CV 值为 15.41%, 如果采用 CV 值和浓度线性回归的方法, CV 为 20% 时 FS 为 20.20 mg/L。

临床检测 PA 时, 低于 16.35 mg/L 的应报告“未检出; 浓度小于 25 mg/L”; 浓度介于 16.35 mg/L~25 mg/L 的应报告“检出, 但不能定量; 浓度大于 25mg/L”; 浓度大于 25 mg/L 的则直接报告检测值。

参考文献

- [1] Obhons A, Roong C, Nantimj K, et al. Impact of liver cirrhosis On nutritional and immunological 8181118[J]. Med Assco Thai, 2001, 84(7):982-988.

- [2] Rondana M, Milani L, Merkel C, et al. Value of prealbumin plasma levels as liver test[J]. Digestion, 1987, 37(2):72-78.
- [3] 李继恩. 900 例肝病患者血清前清蛋白的临床意义[J]. 中国全科医学, 2010, 13(1):14-15.
- [4] 廖严, 何长有, 肖有书. 不同肝病患者血清前清蛋白和清蛋白的检测及意义[J]. 山东医药, 2008, 48(14):116-117.
- [5] 陈宏伟, 李延伟, 范银忠. 肝病患者血清前清蛋白测定的临床意义[J]. 中国误诊学杂志, 2008, 8(6):1348-1349.
- [6] 高泽立, 许洁, 王功大, 等. 肝病患者血清前清蛋白测定的临床意义[J]. 胃肠病学和肝病杂志, 2006, 15(1):69-70.
- [7] 朱建一, 闻平. 血清胆碱酯酶和前清蛋白对肝脏合成功能监测的意义[J]. 临床检验杂志, 2004, 22(6):458.
- [8] 黄燕华, 张秀明, 王伟佳, 等. 电化学发光免疫法检测降钙素原的空白限检出限和功能灵敏度的评价[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(20):2539-2541.
- [9] 韩雪晶, 唐红霞, 甄利, 等. 高敏感方法检测心肌肌钙蛋白 I 的检测限和功能灵敏度的建立及评价[J]. 检验医学, 2013, 28(2):97-101.
- [10] 柯培锋, 韦僑雯, 欧财文, 等. 化学发光法检测 TSH 可报告低值结果的选择与评价[J]. 检验医学, 2010, 25(2):139-141.

(收稿日期:2014-02-14)