

· 论 著 ·

肝素锂对比浊法检测微量总蛋白的干扰分析

赵全能¹, 杨珍珍¹, 万正宇², 李多孚^{1△}

(1. 南充市中心医院检验科, 四川南充 637000; 2. 四川省泸州市第一人民医院, 四川泸州 646099)

摘要:目的 证实肝素锂对比浊法检测微量总蛋白的干扰效应, 并对其进行相关方法性能评价。方法 分别配对检测 8 份不同浓度微量总蛋白尿液干扰标本, 筛查判断肝素锂是否是试验的干扰物; 浓度 0.172、0.427 g/L 微量蛋白质标本中分别加入不同量的肝素锂(干扰物试验系列样品, 肝素锂浓度分别为 0.000、0.025、0.030、0.035、0.040、0.045、0.050 mg/L), 重复检测 4 次, 进行干扰物剂量效应试验。结果 干扰标本检测结果显示, 8 份含肝素锂与不含肝素锂的配对标本中最大偏倚为 159.37%, 最小偏倚为 11.37%, 2 组间结果差异有统计学意义($t=17.24, P<0.05$); 浓度为 0.025 mg/L 肝素锂对 0.172 g/L 微量蛋白质标本干扰效果的 95% 置信区间为 0.034~0.062; 0.030 mg/L 肝素锂对 0.427 g/L 干扰效果的 95% 置信区间为 0.043~0.053; 肝素锂浓度分别为 0.025 mg/mL 和 0.050 mg/mL 时, 0.172 g/L 微量蛋白质标本的结果偏倚分别为 27.33%、58.14%; 肝素锂浓度分别为 0.030 mg/mL 和 0.050 mg/mL 时, 0.427 g/L 微量蛋白质标本的结果偏倚分别为 11.24%、18.74%; 同系列浓度的肝素锂对 0.172 g/L 和 0.427 g/L 微量蛋白质标本的干扰物剂量呈线性相关, 其线性方程分别为 $Y=1.974X-0.00103$, $Y=1.599X-0.0005$ 。结论 肝素锂是比浊法检测微量蛋白质的外源性干扰物, 它对微量蛋白质检测结果为正干扰, 特别对低水平微量蛋白质检测的干扰效果更明显, 且随着肝素锂浓度升高, 干扰效果越强。

关键词: 干扰试验; 微量蛋白质; 尿液; 脑脊液; 肝素锂

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2016.03.032

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2016)03-0364-03

The analysis of heparin lithium interference in turbidimetric method to detect total protein

Zhao Quanneng¹, Yang Zhenzhen¹, Wan Zhengyu², Li Duo fu^{1△}

(1. Department of Clinical Laboratory, Nanchong Central Hospital, Nanchong, Sichuan 637000, China;

2. Luzhou First People's Hospital, Luzhou, Sichuan 646099, China)

Abstract: **Objective** To confirm the interference effect of heparin lithium on turbidimetry method for detecting total protein, and to conduct performance evaluation of it. **Methods** Eight different concentrations of total protein urine specimen with and without heparin lithium were detected respectively, to confirm the interference of heparin lithium on the experiment. Adding different concentration of heparin lithium solution to the prepared total protein samples with concentration of 0.172, 0.427 g/L (a series of interference experiment samples, with heparin lithium concentrations of 0.000, 0.025, 0.030, 0.035, 0.040, 0.045, 0.050 mg/L), repeat four times detection, and then conduct the dose-effect experiment of interference. **Results** The biggest bias of the testing results in the two paired samples was 159.37%, the mini-bias was 11.37%, the difference of the results in two groups was statistical significant ($t=17.24, P<0.05$). 95% confidence interval of the interference effect in the total protein samples with concentration of 0.172 g/L was 0.034~0.062, while in the total protein samples with concentration of 0.427 g/L was 0.043~0.053. When the heparin lithium were 0.025 mg/mL and 0.050 mg/mL respectively, the results of bias of the total protein samples with concentration of 0.172 g/L were 27.33%, 58.14% respectively. But in the 0.427 g/L total protein samples, the results of bias were 11.24%, 18.74% respectively. Dose effect of interference both showed a linear relationship in the series concentration of the heparin lithium and interference of sample of 0.172 g/L and 0.427 g/L, and the linear equations were $Y=1.974X-0.00103$, $Y=1.599X-0.0005$ respectively. **Conclusion** Heparin lithium is the exogenous interfering substance to the detection of total protein in turbidimetry method, it is the positive interference to the determination results of total proteins, especially for the low level of total protein detection, and as heparin lithium concentration increases, the stronger the interference effect.

Key words: interference test; total protein; urine; cerebrospinal fluid; heparin lithium

微量蛋白质的检测主要用于尿液和脑脊液标本检测, 这些标本中蛋白质水平升高是早期肾病、糖尿病、高血压、甲状腺疾病、脑膜炎、脑肿瘤和中枢神经系统感染等疾病的诊断和疗效观察的重要指标。影响微量蛋白质检测结果的因素较多, 其中干扰物对试验的干扰是重要的影响因素之一。在应用比浊法检测微量蛋白质过程中, 发现肝素锂污染以上标本后, 可能导致微量蛋白质结果明显升高的现象, 肝素锂是否是影响比浊法检测微量蛋白质结果的干扰物质? 目前相关文献鲜有报道。本研究按照 WS/T416-2013《中华人民共和国卫生行业标准——干扰实验指南》, 对此进行了探讨, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 标本来源 8 份含不同水平的微量蛋白质新鲜随机尿液, 离心, 待用。2 份含微量蛋白质浓度为 0.172、0.427 g/L 的新鲜随机尿液标本, 离心, 待用。

1.2 仪器与试剂 日立 7600-110 型生化分析仪。微量总蛋白检测试剂由罗氏诊断有限公司生产, 批号 601011-01。肝素锂由博美生物科技有限公司生产, 批号 S856V1123。

1.3 方法

1.3.1 比浊法 标本预先在含有乙二胺四乙酸(EDTA)的碱性溶液中孵育, 使其中的蛋白质变性, 并消除镁离子的干扰性,

然后加入芞索氯铵,产生的浊度与蛋白质浓度成正比,505 nm 处读取吸光度(OD)值。

1.3.2 配制干扰物 将肝素锂用生理盐水配制成浓度为 1 mg/mL 的干扰物原液,再稀释成浓度为 0.50、0.60、0.70、0.80、0.90、1.00 mg/mL 系列溶液,于 2~8 °C 保存待用。

1.3.3 干扰筛查试验 8 份含不同浓度的微量蛋白质尿液标本 4 200 r/min 离心 5 min。每份标本各分装 2 份,每份 0.95 mL。其中 1 份加入肝素锂原液 0.05 mL(浓度 0.05 mg/mL)为干扰标本;另 1 份加入生理盐水 0.05 mL 为对照标本。以上标本,混匀后,按 1→8,8→1 顺序各重复检测 4 次,记录结果。

1.3.4 肝素锂干扰比浊法检测微量蛋白质的判断标准 干扰筛查试验配对标本间的结果差异有统计学意义($P < 0.05$),且偏倚大于或等于 10%。其判定依据以下标准:(1)CLIA'88 常见生化质量指标中总蛋白的允许总误差小于 10%^[1];(2)本试剂盒声明(见试剂盒说明书)检测微量蛋白质的最大变异系数(CV)不超过 5.3%,偏倚大于或等于 10%则完全排除试验不精密度引起的试验误差。

1.3.5 干扰物剂量效应评价试验 按文献[1-2]的方法进行干扰物剂量效应评价试验。用浓度为 0.172、0.427 g/L 的微量蛋白尿液标本,制备对照样品和试验样品。(1)对照标本:0.95 mL 尿液标本与 0.05 mL 生理盐水混合制备,肝素锂浓度为 0.000。(2)试验标本:0.95 mL 尿液标本与 0.05 mL 不同浓度的肝素锂溶液混合,配制含肝素锂终浓度为 0.025、0.030、0.035、0.040、0.045、0.050 mg/mL 的 6 个系列试验样品。每个浓度标本分为 4 支,待用。将上述所有样品按干扰物浓度从低到高、从高到低、再从低到高的顺序,4 次重复检测,记录检测结果。

1.4 统计学处理 采用 Excel2007 软件进行数据处理及统计学分析。配对资料组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。参考文献[1]计算干扰效果的 95%置信区间。采用直线相关分析评价干扰效果是否呈线性相关。

2 结 果

2.1 肝素锂对比浊法检测微量蛋白质结果的干扰筛查 检测 8 份干扰筛查(配对)标本,干扰标本与对照标本结果间最小偏倚是 11.37%,最大偏倚是 159.37%,2 组标本检测结果比较,差异有统计学意义($t = 17.24, P < 0.05$)。见表 1。

表 1 肝素锂(0.05 mg/mL)对 8 份标本检测微量蛋白的干扰筛查结果

标本编号	对照标本(g/L)	干扰标本(g/L)	偏倚(%)
1	0.096	0.249	159.37
2	0.145	0.289	99.31
3	0.198	0.337	70.20
4	0.208	0.343	64.90
5	0.250	0.387	54.80
6	0.287	0.415	44.61
7	0.897	0.999	11.37
8	1.231	1.314	6.74

2.2 干扰物剂量效应评价试验 不同浓度肝素锂对低浓度微量蛋白质(0.172 g/L)标本和病理浓度微量蛋白质(0.427 g/L)标本的干扰效果和偏倚见表 2~3。

2.3 干扰效应的 95%置信区间 含 0.172 g/L 微量蛋白质标

本,0.025 mg/L 肝素锂干扰效果的 95%置信区间为 0.034~0.062;而 0.427 g/L 微量蛋白质标本,0.030 mg/L 肝素锂干扰效果的 95%置信区间 0.043~0.053。

2.4 干扰物剂量相关的线性 肝素锂分别对含 0.172、0.427 g/L 微量蛋白标本的干扰物剂量相关线性分析,其线性方程分别为 $Y = 1.974X - 0.00103$ ($r = 0.999, t = 1039.94, P < 0.05$); $Y = 1.599X - 0.0005$ ($r = 0.997, t = 761.43, P < 0.05$)。

表 2 肝素锂对尿液微量蛋白测定(0.172 g/L)的干扰效果

标本编号	肝素锂浓度(mg/L)	4 次测量均值(g/L)	4 次测量 CV(%)	偏倚(%)	干扰效果
1	0.000	0.172	2.33	—	0.000
2	0.025	0.219	0.18	27.33	0.047
3	0.030	0.230	0.83	33.72	0.058
4	0.035	0.241	0.83	40.12	0.069
5	0.040	0.247	1.62	43.60	0.075
6	0.045	0.260	1.15	51.16	0.088
7	0.050	0.272	1.47	58.14	0.100

—:无数据。

表 3 肝素锂对尿液微量蛋白测定(0.427 g/L)的干扰效果

标本编号	肝素锂浓度(mg/L)	4 次测量均值(g/L)	4 次测量 CV(%)	偏倚(%)	干扰效果
1	0.000	0.427	0.47	—	0.000
2	0.025	0.467	1.07	9.37	0.040
3	0.030	0.475	1.26	11.24	0.048
4	0.035	0.479	0.42	12.18	0.052
5	0.040	0.489	1.02	14.52	0.062
6	0.045	0.501	0.80	17.33	0.074
7	0.050	0.507	0.59	18.74	0.080

—:无数据。

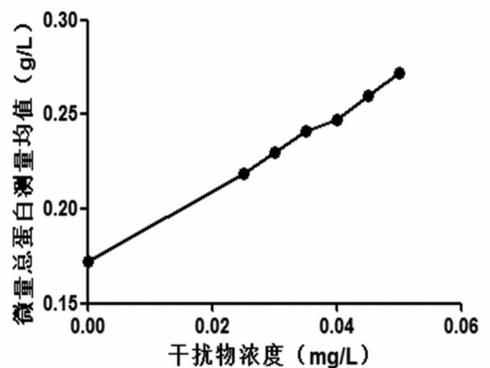


图 1 微量蛋白浓度为 0.172 g/L 时干扰效果

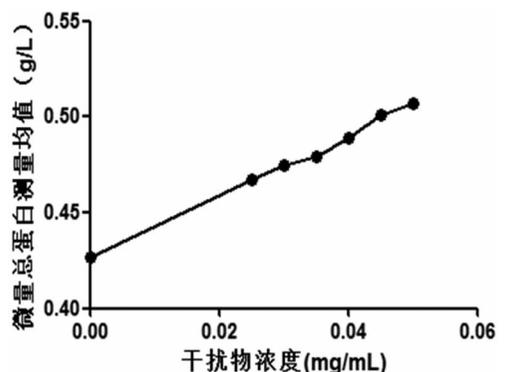


图 2 微量蛋白浓度为 0.427 g/L 时干扰效果

2.5 干扰物浓度与微量蛋白质测量值的关系 肝素锂可致微量蛋白质测定结果明显升高,它对 0.172 g/L 水平微量蛋白质检测的干扰效果,较对 0.427 g/L 水平微量蛋白质检测更明显。见图 1~2。

3 讨论

笔者在工作中发现肝素锂污染微量蛋白质标本后,应用比浊法检测微量蛋白质,其结果明显升高。本文参考文献[1],围绕干扰,进行了相关方法性能评价。

本文对所检测试验标本,均重复了 4 次,并计算了批内精密度,结果显示,比浊法检测微量蛋白质的最大 CV(2.77%)小于试剂盒说明书最大允许 CV(5.3%),同时也未超过蛋白质测定的试验允许总误差(10%)。由此说明,干扰筛查试验中干扰(配对)标本结果间的偏倚不是由试验变异引起的,而是肝素锂的干扰作用结果。本研究结果还证实,肝素锂对检测不同浓度微量蛋白质的干扰效果呈线性相关,从线性方程可见,斜率为正值,表明其肝素锂引起干扰为正干扰,当样品中污染肝素锂时,可以导致检测结果明显升高。

有文献指出,在测定分析物过程中,不同浓度的干扰物所产生的干扰作用有一定的差异,因此在进行配对差异试验时有必要选择合适的干扰物浓度^[2]。本研究的干扰物剂量效应评价试验结果证实了不同浓度肝素锂对含同样浓度微量蛋白质标本的干扰作用存在明显差异,表明一定浓度微量蛋白质标本随着肝素锂浓度的增加,干扰效果明显增强。另一方面,随着标本中微量蛋白质浓度增加,同浓度的肝素锂对检测结果的干扰效果明显减少,0.05 mg/mL 肝素锂的干扰效果也只是在一定分析物浓度范围内出现,即当标本中微量蛋白浓度高于

1.1~1.2 g/L 时,该浓度肝素锂的干扰效果可能已不明显。

参考试验盒尿液微量蛋白质参考区间和临床病理诊断意义,选择参考区间高限接近浓度(0.172 g/L)及病理浓度(0.427 g/L)作为试验标本浓度,这 2 种浓度有利于观察干扰效果,评价干扰导致的误差属性。可以认为,本试验干扰产生的误差既是比例系统误差,也是恒定系统误差。

肝素锂对比浊法检测微量蛋白质的干扰机制还有待探讨。但观察它的干扰效果及其干扰的有限性,推测其机制可能是:一定浓度(>0.025 mg/mL)的肝素锂,在一定 pH 条件下,锂离子可能与苜蓿氯铵反应,形成悬浮颗粒状物质,从而增加液体浊度,随即引起一定浓度范围(小于 1.0 g/L)的微量蛋白质结果假性升高。当然,这一推论还需进一步研究证实。

本研究表明,肝素锂是比浊法检测微量蛋白质的外源性干扰物,它对微量蛋白质检测结果为正干扰,特别对低水平微量蛋白质检测的干扰效果更明显,且随着肝素锂浓度升高,干扰效果越强。

参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部. WST-416-2013 中华人民共和国卫生行业标准——干扰实验指南[S]. 北京:中华人民共和国卫生部, 2013.
- [2] Clinical and Laboratory Standards Institute. EP7-A2 Interference testing in clinical chemistry[S]. Wayne, PA, USA: CLSI, 2002.

(收稿日期:2015-10-25)

(上接第 363 页)

李俊立等^[4]报道的数据范围窄,较田峰^[7]报道的数据范围宽,可能与本研究使用的仪器、试剂、具体操作方法不同有关。

在探讨 FS 时直接采用一系列低浓度患者标本,与采用系列稀释低浓度样品的方法比较^[8],可避免由于稀释操作或基质效应可能引起的各种误差。

虽然本研究所建立的 AMR 较厂家声明的数据范围宽,但在临床常规检测中还是存在相当多的超出 847.500 U/L 的标本,还需进行适当倍数稀释后处理。这就涉及用何种稀释介质和最大允许稀释度的问题。本研究参照试剂说明书,直接采用生理盐水作为稀释介质。结果显示, MAD 为 1:8,且发现随稀释倍数增大所得回收率也增大。而朱爱萍等^[9]报道用生理盐水稀释时在 1:3 倍以内与原倍血清测定结果比较差异无统计意义($P>0.05$),且随稀释倍数增大所得回收率逐渐降低,笔者推测以上差异除与本研究采用不同的试剂、仪器、质量管理目标要求有关外,与试验所用的稀释介质引起基质效应的关系更大^[10]。与姚少羽等^[3]报道的结果也有区别,可能与本研究测定方法学不同有关。通过确定 MAD,为在日常操作时对高水平标本的稀释提供了可靠依据。本研究结合 FS、AMR 和 MAD,最后建立的 CRR 为 3.698~6 780.000 U/L,可满足临床常规需要。

综上所述,本研究通过分析德赛诊断生化试剂采用 Beckman Dxc800 生化分析仪进行血清 ALT 检测的自建检测系统的 AMR 和 CRR 等相关性能,确定了该项目在本试验室日常检测工作中的准确性。同时也提醒广大检验工作者不同试验室检测系统具体的分析性能也不同,在实际应用中应对其进行验证,以确保检测结果可靠性^[11]。

参考文献

- [1] 毕波,吕元. 定量检测方法学性能验证的系统设计[J]. 中华检验医学杂志, 2007, 30(2): 143-145.
- [2] 杨有业,张秀明. 临床检验方法学评价[M]. 北京:人民卫生出版社, 2008: 142-193.
- [3] 姚少羽,孙艳虹,高玲,等. Vitros950 生化检测系统最大稀释度测定[J]. 中国实用医药, 2008, 3(34): 31-34.
- [4] 李俊立,彭长华,王昌富. BACKMAN LX20 生化检测系统 ALT 可报告范围的评价[J]. 现代检验医学杂志, 2010, 25(6): 71-73.
- [5] Jhang JS, Chang CC, Fink DJ, et al. Evaluation of linearity in the clinical laboratory[J]. Arch Pathol Lab Med, 2004, 128(1): 44-48.
- [6] Kroll MH, Praestgaard J, Michaliszyn E, et al. Evaluation of the extent of nonlinearity in reportable range studies[J]. Arch Pathol Lab Med, 2000, 124(9): 1331-1338.
- [7] 田峰. 贝克曼 CX4 生化仪上使用开放试剂测试肝功能项目的探讨[J]. 现代检验医学杂志, 2007, 22(2): 84-85.
- [8] 陈斌鸿,罗恒,李炜焯,等. 奥林巴斯 AU5400 全自动生化分析仪检测尿素氮临床可报告范围的建立与评价[J]. 实验与检验医学, 2011, 29(2): 117-120.
- [9] 朱爱萍,吕秀英,郭书云. 不同稀释介质对 15 个生化项目测定的影响[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(3): 214-216.
- [10] 李萍. 临床实验室管理学[M]. 北京:高等教育出版社, 2006: 254-264.
- [11] 万腊根,孔蕴源,罗清,等. 定量检测系统临床可报告范围评价方法的探讨[J]. 现代检验医学杂志, 2010, 25(5): 150-152.

(收稿日期:2015-10-07)