

论著 • 临床研究

改良比色法在全自动生化分析仪加样重复性与准确度校准中的应用*

王志伟¹,蔡永梅¹,毛东英¹,刘京¹,杨萍¹,王利新^{1△},闫鹏²

(1. 宁夏医科大学总医院医学实验中心,宁夏银川 750004;

2. 西门子医学诊断产品(上海)有限公司,上海 200120)

摘要:目的 探讨采用改良传统比色法,实现全自动生化分析仪样本、试剂加注重复性和准确度的测量。**方法** 在生化分析仪开放通道设置不同方法对标准物质 BW 2025-1 按照特定比例进行稀释并测定吸光度,计算所测吸光度的变异系数和误差,校准样本和试剂加注的重复性和准确度。**结果** 测试项目吸光度变异系数均小于 2%,表明加样重复性符合要求;测试项目误差均在±5%范围内,表明加样准确度符合要求。**结论** 通过对传统比色法进行改良,可实现全自动生化分析仪试剂与样本加注重复性和准确度的校准,该方法简单,便于操作,受影响因素少,可行性强。

关键词:样本加注; 试剂加注; 重复性与准确度; 全自动生化分析仪

DOI:10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2019. 22. 013 **中图法分类号:**R446. 1, R. 331

文章编号:1673-4130(2019)22-2742-04 **文献标识码:**A

Precision and accuracy calibration of sample and reagent aspiration for automatic chemistry analyzer*

WANG Zhiwei¹, CAI Yongmei¹, MAO Dongying¹, LIU Jing¹, YANG Ping¹, WANG Lixin^{1△}, YAN Peng²

(1. The Medical Laboratory Center of General Hospital of Ningxia Medical

University, Yinchuan, Ningxia 750004, China; 2. Siemens Medical Diagnostic

Products(Shanghai) co., LTD, Shanghai 200120, China)

Abstract: **Objective** To explore the application of improved traditional colorimetric method to realize the measurement of samples and reagents of automatic biochemical analyzer with emphasis on refolding and accuracy. **Methods** The standard substance BW 2025-1 was diluted and its absorbance was determined by different methods in the open channel of biochemical analyzer. The coefficient of variation and error of absorbance were calculated, and the repeatability and accuracy of calibration samples and reagent injection were also calculated. **Results** The absorbance variation coefficients of the test items were less than 2%, which indicated that the repeatability of the sample addition met the requirements. The errors of the test items were within the range of (±5%), which indicated that the accuracy of the sample addition met the requirements. Variable coefficients of all test results are less than 2%, mean precisions meeting requirement of the standard. Errors of all tests were within ±5%, mean accuracy meeting the requirement. **Conclusion** By improving the traditional colorimetric method, the reagent and sample of automatic biochemical analyzer can be calibrated with emphasis on refolding and accuracy. This method is simple, easy to operate, less affected by factors and strong feasibility.

Key words: sample injection; reagent injection; repeatability and accuracy; automatic biochemical analyzer

样本和试剂加注重复性和准确度测定是全自动生化分析仪校准过程中的难点^[1],采用称量法需控制仪器试剂针或样品针将特定体积的液体转移至指定容器,用电子天平称量并计算所转移液体的体积^[2]。

然而,多数全自动生化分析仪并不支持上述液体转移的特定测试序列且在实验室环境进行微量称量受干扰因素较多,可操作性差。传统的比色法理论上可对样本的加注情况进行测定,然而主流的全自动生化分

* 基金项目:宁夏回族自治区重点研发计划(科技支撑专项)(2019BEG03014);宁夏医科大学研究基金项目(XM2018091)。

作者简介:王志伟,男,正高职高级工程师,主要从事临床检验仪器维护、维修、校准等研究。△ 通信作者, E-mail: 13895630916@163.com。

本文引用格式:王志伟,蔡永梅,毛东英,等. 改良比色法在全自动生化分析仪加样重复性与准确度校准中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(22): 2742-2744.

析仪首先加入比色杯的是试剂一而不是样本,且两者加注间隔时间非常短,采用比色法对其中之一进行测定难度很大。比色法通过加注、回收和定容,稀释所加注射色素原液、确定稀释倍数,测定稀释后色素原液与内标物吸光度,计算色素原液加注体积。基于此,笔者对比色法进行改良,在全自动生化分析仪设定特定的检测程序,对吸光度已知的标准物质进行稀释,测量稀释后的吸光度并与理论吸光度值进行对照,测定样本和试剂加注的重复性与准确度。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 西门子 ADVIA 2400 全自动生化分析仪;BW 2025-1 生化分析仪校准用溶液标准物质-吸光度^[3-4],由中国计量研究科学院提供。

1.2 方法

1.2.1 参数设置 在西门子 ADVIA 2400 全自动生化分析仪开放通道按表 1 要求定义检测方法。其中 ORIGI-1 对标称为 0.981A 的生化分析仪校准用溶液标准物质-吸光度 BW 2025-1 进行测定,确定标准物质在该仪器检测时的准确吸光度;S-25、S-5 和 S-2 分别对 25、5、2 μL 的样本加注量进行测量;D-STD 和 D-SPE 分别对 30、5 μL 原样量加注、稀释情况进行测

量;R1-50 和 R2-10 对试剂一常用加注量 50 μL 及试剂二常用加注量 10 μL 进行测量。见表 1。

1.2.2 水参比测试 不同稀释条件下测定 BW 2025-1 吸光度均以去离子水作参比,因此,确认项目参数设置无误后,同时以去离子水为试剂和样本运行所有项目定标,获得水参考吸光度。注意,不能以试剂空白代替水参考。见表 2。

1.2.3 获取吸光度 正确获取水参比后,按表 2 所示要求放置样本和试剂,运行所有检测项目 20 次,读取吸光度值。表中标准物为 BW 2025-1,稀释液为 0.05 mol/L 硫酸。

2 结 果

读取各测试程序吸光度值后,分别计算其均值、标准差及变异系数,评估试剂和样本加注的重复性,所有测试项目变异系数均处于 2% 的允许变化范围之内^[2]。根据 BW 2025-1 在仪器测定均值及 BW 2025-1 被稀释的比例计算各测试项目的理论吸光度值,结合各项目 20 次测定均值计算误差,评估试剂和样本加注的准确度,所有测试项目误差均处于 $\pm 5\%$ 的允许范围内^[2],试验仪器样本与试剂加注的重复性和准确度均满足要求,见表 3。

表 1 测试方法参数设置

方法名称	ORIGI-1	S-25	S-5	S-2	D-STD	D-SPE	R1-50	R2-10
R1 量(μL)	60	100	100	60	100	40	50	100
R2 量(μL)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	100	10
样本量(μL)	2	25	5	2	25	25	25	25
样本稀释	NONE	NONE	NONE	NONE	30 : 150	5 : 75	NONE	NONE
测定波长(nm)	340	340	340	340	340	340	340	340
读点	14、15	14、15	14、15	14、15	14、15	14、15	39、40、41	39、40、41
定标方法	ABS	ABS	ABS	ABS	ABS	ABS	ABS	ABS

表 2 各测试方法样本、试剂要求

方法名称	ORIGI-1	S-25	S-5	S-2	D-STD	D-SPE	R1-50	R2-10
R1	标准物	稀释液	稀释液	稀释液	稀释液	稀释液	标准物	稀释液
R2	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	稀释液	标准物
样本	标准物	标准物	标准物	标准物	标准物	标准物	稀释液	稀释液

表 3 各测试方法吸光度重复性与准确度

项目	ORIGI-1	S-25	S-5	S-2	D-STD	D-SPE	R1-50	R2-10
Rep1	0.877 43	0.167 20	0.041 80	0.027 82	0.036 34	0.023 07	0.250 55	0.068 06
Rep2	0.882 12	0.167 85	0.042 31	0.027 62	0.036 43	0.023 19	0.250 70	0.068 04
Rep3	0.878 65	0.168 22	0.041 73	0.027 66	0.036 63	0.022 78	0.250 88	0.068 07
Rep4	0.880 66	0.166 56	0.041 87	0.027 44	0.036 38	0.023 55	0.250 17	0.067 90
Rep5	0.879 78	0.166 57	0.041 85	0.029 43	0.036 38	0.022 77	0.251 57	0.068 64
Rep6	0.877 45	0.166 67	0.041 88	0.027 64	0.036 27	0.023 45	0.251 53	0.068 40
Rep7	0.878 85	0.168 00	0.042 57	0.027 43	0.036 38	0.023 27	0.250 45	0.068 44

续表 3 各测试方法吸光度重复性与准确度

项目	ORIGI-1	S-25	S-5	S-2	D-STD	D-SPE	R1-50	R2-10
Rep8	0.878 10	0.166 76	0.041 69	0.027 04	0.036 37	0.023 53	0.250 73	0.068 34
Rep9	0.882 16	0.166 88	0.041 91	0.027 41	0.036 73	0.023 78	0.260 92	0.068 19
Rep10	0.876 43	0.169 11	0.041 66	0.027 43	0.036 31	0.023 24	0.250 23	0.068 01
Rep11	0.880 38	0.167 30	0.041 65	0.027 66	0.036 42	0.023 56	0.250 48	0.068 33
Rep12	0.880 86	0.169 12	0.041 65	0.027 77	0.036 13	0.022 95	0.250 77	0.067 74
Rep13	0.878 03	0.167 48	0.041 95	0.027 28	0.036 32	0.023 22	0.251 36	0.067 51
Rep14	0.879 62	0.166 33	0.041 74	0.027 53	0.036 35	0.022 68	0.250 26	0.068 14
Rep15	0.878 69	0.169 47	0.041 31	0.027 53	0.036 52	0.022 80	0.250 40	0.068 39
Rep16	0.878 53	0.167 87	0.041 46	0.028 12	0.036 51	0.023 19	0.251 47	0.068 68
Rep17	0.879 98	0.166 92	0.041 97	0.027 62	0.036 64	0.023 84	0.250 62	0.067 62
Rep18	0.881 11	0.168 11	0.041 76	0.027 43	0.036 52	0.023 65	0.250 98	0.067 90
Rep19	0.879 14	0.168 54	0.042 07	0.027 86	0.039 18	0.022 90	0.251 77	0.067 72
Rep20	0.877 35	0.167 97	0.041 51	0.027 58	0.036 22	0.022 66	0.251 00	0.067 65
均值	0.879 27	0.16765	0.041 82	0.027 67	0.036 55	0.023 20	0.251 34	0.068 09
标准差	0.001 61	0.000 93	0.000 28	0.000 46	0.000 62	0.000 36	0.002 25	0.000 33
变异系数(%)	0.18	0.56	0.66	1.67	1.69	1.56	0.89	0.49
变异系数范围	<1.5	<2.0	<2.0	<2.0	<2.0	<2.0	<2.0	<2.0
稀释倍数	—	5	21	31	25	39	3.5	13.5
理论值	0.879 27	0.175 85	0.041 87	0.028 36	0.035 17	0.022 55	0.251 22	0.065 13
误差(%)	—	−4.67	−0.13	−2.46	3.93	2.92	0.05	4.54
误差范围(%)	—	±5	±5	±5	±5	±5	±5	±5

注：—表示此项无数据

3 讨 论

不同生化分析仪比色杯光径存在差异,标准物质上机检测时读取的吸光度亦不同^[5-6]。在进行加样准确度和重复性测试前应当设置程序获得标准物质实测吸光度值,该测定结果不依赖于试剂或样本加注的准确度和重复性,且 20 次测定的变异系数应当小于 1.50%^[2]。所有测试程序加注液体的总量均不得低于仪器最小标称反应体积。改良的比色法实质是将标准物质 BW 2025-1 按照特定比例稀释检测吸光度,稀释倍数不宜过大,稀释倍数过大(如大于 50 倍或 100 倍)导致 BW 2025-1 过度稀释,获得的吸光度值过低、接近仪器吸光度分辨率而产生测量误差。BW 2025-1 的基体为 0.05 mol/L 硫酸,不宜用去离子水作为稀释剂。实际上,也可用吸光度已知、状态稳定的染料或色素原液代替标准物质 BW 2025-1,对传统的比色法进行改良,实现全自动生化分析仪样本与试剂加注准确度和重复性的测试。在进行样本(或试剂)加注测试时,应当将试剂(或样本)的加注量设为最大,降低不确定度的引入;在进行仪器最小加样量测试时,应当兼顾最小反应体积和稀释比例,合理设置参数。运行测试前进行水参比测试也是必须的,否则测得的吸光度与稀释倍数不相关,无法进行加注准确度判断。为避免温度和放置时间对标准物质 BW

2025-1 影响,所有测试均应尽可能在同一时间、同一批次完成。

校准前应当对生化分析仪作必要的维护^[7],如检查液体管路,更换注射器密封组件,必要时更换样本或试剂针,确保仪器工作状态良好;样本加注重复性和准确度测试点(校准点)选择 25 μL(最大)、2 μL(最小)及 5 μL;样本稀释重复性和准确度测试点(校准点)选择 30 μL(30 : 150,STANDARD,常用)及 5 μL(5 : 75,微量);试剂加注重复性和准确度测试点(校准点)选择试剂 1 常用加注体积 50 μL 及试剂 2 常用加注体积 10 μL。所有校准点的选择须兼顾样本或试剂的常用加注体积以保证校准测试的有效性。该方法除用于定期校准测试外,还可用于生化分析仪样本或试剂分配系统故障的排查,亦可结合反应曲线对试剂混匀情况进行测试。

生化分析仪加样准确度和重复性测试的首选方法是称量法,但是称量法实现的前提是仪器能够提供特定的测试程序予以支持,加之受实验室的环境、称量设备、人员素质等因素的限制,称量法在实验室实施并不可行且操作不当有可能引入很大的不确定度,不能真正考察仪器试剂和样本的加注准确度和重复性^[3,8-9]。采用改良比色法,只需设定测试程序、运行实验、统计分析数据即可完成生化(下转第 2748 页)

在尿液标本结核分支杆菌检测的灵敏度低于痰标本，其原因与泌尿系结核患者排菌量较低并且呈间断性有关，提示可以通过留取更多标本进行集菌后检测来提高其灵敏度。

4 结 论

3 种实验室检测方法 with 临床诊断“金标准”法比较，经 Kappa 检验，Xpert MTB/RIF 和固体培养法具有很高的一致性。研究数据表明 GeneXpert 在检测性能上优于涂片抗酸染色和结核杆菌固体培养，该方法可以为临床早期、快速诊断泌尿系结核提供实验室依据。

参考文献

[1] GLOBAL TUBERCULOSIS REPORT. Global Tuberculosis Report 2018. [EB/OL]. (2018-08-09)[2019-05-27]. https://www.who.int/tb/publications/global_report/en/.

[2] PANG Y, AN J, SHU W, et al. Epidemiology of extrapulmonary tuberculosis among inpatients, China, 2008—2017 [J]. Emerg Infect Dis, 2019, 25(3): 457-464.

[3] OHENE S A, BAKKER M I, OJO J, et al. Extra-pulmonary tuberculosis: a retrospective study of patients in Accra, Ghana [J]. PLoS ONE, 2019, 14(1): e0209650.

[4] 李秀武, 刘建强, 郑荣坤. FQ-PCR 技术在肺外结核中的诊断价值[J]. 中国防痨杂志, 2010, 32(12): 818-821.

[5] ABBARA A, DAVIDSON R N. Etiology and management of genitourinary tuberculosis [J]. Nat Rev Urol, 2011, 8(12): 678-688.

[6] 李波, 吴进凤, 欧喜超, 等. 荧光染色镜检、改良罗氏培养

在肺结核实验室诊断中的应用[J]. 临床肺科杂志, 2018, 23(7): 1165-1168.

[7] 唐书福, 刘权贤, 张建勇, 等. 胸腔镜联合胸水 gene-Xpert 在结核性胸膜炎中的诊断评价[J]. 中华医院感染学杂志, 2018, 28(22): 3434-3437.

[8] 蔡侃儒, 彭巧丽, 汪文斐, 等. 支气管肺泡灌洗液 Xpert MTB/RIF 检测在 HIV 感染者肺结核诊断中的应用价值[J]. 中国艾滋病性病, 2018, 24(6): 544-547.

[9] 中华医学会. 临床诊治指南(结核病分册)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 64-86.

[10] 夏邦世, 吴金华. Kappa 一致性检验在检验医学研究中的应用[J]. 中华检验医学杂志, 2006, 29(1): 83-84.

[11] 杜鹏, 郑文斌, 卢留珠, 等. Xpert MTB/RIF 和荧光定量 PCR 在痰液标本中快速检测结核分支杆菌的比较[J]. 中国实验诊断学, 2018, 22(4): 656-659.

[12] 张佳, 冯晓燕, 张贺秋, 等. 结核分支杆菌的富集方法及其在检测中的应用[J]. 中国卫生检验杂志, 2018, 28(22): 2813-2816.

[13] 范秀博, 闫菊娥, 李毓新, 等. Xpert Mtb/RIF 技术在结核性脑膜炎诊断中的应用[J]. 山东医药, 2017, 57(43): 61-63.

[14] PANG Y, SHANG Y, LU J, et al. GeneXpert MTB/RIF assay in the diagnosis of urinary tuberculosis from urine specimens [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 1-5.

[15] HSIANG E, LITTLE K M, HAGUMA P, et al. Higher cost of implementing Xpert MTB/RIF in Ugandan peripheral settings: implications for cost-effectiveness [J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2016, 20(9): 1212-1218.

(收稿日期: 2019-03-16 修回日期: 2019-05-28)

(上接第 2744 页)

分析仪加样系统的校准, 对人员、环境条件、设备等要求较低, 简单易行^[8,10]。

4 结 论

合理设置分析方法, 使全自动生化分析仪按照特定比例对标准物质 BW 2025-1 进行稀释, 改良传统比色法, 可实现全自动生化分析仪试剂与样本加注重复性和准确度的测试、评估(校准)。该方法简单、便于操作, 受影响因素少, 可操作性强^[9-10]。

参考文献

[1] 张蕊, 刘丽丽. 简述生化分析仪标准物质的研究现状及发展趋势[J]. 科技与企业, 2013, 22(6): 365-366.

[2] 国家食品药品监督管理总局. 全自动生化分析仪: YY/T 0654—2017[S]. 北京: 国家食品药品监督管理局, 2017.

[3] 邱玲. ISO 15189 评审自动生化分析仪使用中的常见不符合项及解决方案[J/CD]. 中华临床实验室管理电子杂志,

2015, 4(3): 198-201.

[4] 万卓. 全自动生化分析仪校准方法[J]. 化学计量与分析技术, 2016, 22(6): 180-182.

[5] 金鑫. 全自动生化分析仪 ADVIA2400 校准方法探讨[J]. 化学计量与分析技术, 2017, 26(5): 181-183.

[6] 王艳秋, 于群, 周玉贵, 等. 医药行业标准 YY/T 0654—2008 在评价生化分析仪性能中的应用[J]. 临床检验杂志, 2013, 12(31): 891-893.

[7] 王志伟, 倪蓝, 魏军. 全自动生化分析仪校准存在的问题[J]. 检验医学, 2014, 12(29): 1260-1262.

[8] 杨晓英. 《全自动生化分析仪校准规范》编制说明[J]. 计量与测试技术, 2016, 5(43): 104-105.

[9] 李名兆. 浅谈全自动生化分析仪的校准[J]. 中国测试技术, 2004, 5(30): 26-28.

[10] 杨彦琴, 安徽. 生化分析仪计量检定的研究[J]. 医疗设备信息, 2000, 15(3): 1-2.

(收稿日期: 2019-03-26 修回日期: 2019-06-08)