

• 临床检验研究论著 •

血清总蛋白参考方法建立及不确定度评估

赖文泉, 王 磊, 王英国[△], 陈 明, 余枝广

(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司 518057)

摘要:目的 建立血清总蛋白(TP)参考方法,评价其性能,并评估其测量结果不确定度。方法 根据国际医学检验溯源联合委员会(JCTLM)相关文件要求建立血清 TP 参考方法,对仪器、试剂、加样、温度等主要试验条件进行确认和优化,对方法灵敏度、精密性、线性、准确度进行评价,测量结果不确定度根据 ISO 不确定度评估指南进行评估。结果 参考方法使用的仪器设备及试剂性能满足方法要求;反应条件为 37 ℃ 孵育 10 min;方法灵敏度为 0.005 82,室内测量不精密度小于 0.7%,0~120 g/L 线性范围良好;室间比对结果无统计学差异($P>0.05$);参加 TP 国际参考实验室质量比对计划,样本测定结果在等效范围内,相对标准不确定度 1.8%。结论 成功建立血清 TP 参考方法,性能指标满足要求,初步评估了测量结果不确定度,可用于 TP 测定的量值溯源和标准化。

关键词:总蛋白; 参考方法; 性能评价; 不确定度

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.18.014

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)18-2204-03

Establishment and uncertainty evaluation of reference method of total protein

Lai Wenquan, Wang Lei, Wang Yingguo[△], Chen Ming, Yu Zhiguang

(Shenzhen Mindray Bio-medical Electronics Co., Ltd, Shenzhen, Guangdong 518057, China)

Abstract: **Objective** To establish the reference methods of serum total proteins(TP) and evaluate its analytical performance and measurement uncertainty. **Methods** The reference method was established according to relative documents of JCTLM. The measurement condition was verify and optimized, and the sensitivity, precision, linearity, and accuracy of the methods were evaluated. The uncertainty of the result was evaluated according to GUM. **Results** The instruments including spectrophotometer, analytical balance, pipettes were verified and the reagents meet method requirements. The reaction condition was optimized to temperature of 37 ℃ and time of 10 min. The sensitivity of the TP reference method was 0.005 82, and intra-Lab imprecision was less than 0.7%, the linear range was 0—120 g/L. There was no significant differences ($P>0.05$) between two Labs. The results of the method were located within the limits of equivalence in the IFCC ring trail for reference laboratories, and the uncertainty was 1.8%. **Conclusion** The reference method of total proteins was successfully established. The performance of the method met the requirements, and the uncertainty of the procedure was adequately evaluated. The established reference method could be used for traceability and standardization.

Key words: total protein; reference method; performance evaluation; uncertainty

总蛋白(TP)是血清固体成分中含量最多的一类物质,包括球蛋白和清蛋白,具有极其重要的生理功能。TP 检测是临床重要检测项目,对了解机体营养状况,以及肝脏和肾脏病变的诊断、治疗判断与监测等具有重要作用^[1]。参考方法用于检测项目的量值传递和性能评估等,其建立是实现临床检测结果准确性和可比性的重要条件^[2]。本研究根据国际医学检验溯源联合委员会(JCTLM)的要求建立 TP 检测参考方法^[3-4],对主要实验条件进行确认,并评估方法性能和测量结果不确定度,以用于 TP 检测量值溯源和标准化。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 Perkin Elmer PE650 紫外可见分光光度计及配套石英比色杯, FLUKE 1521 精密测温仪, Mettler Toledo 精密电子天平, Eppendorf Reference 移液器; Polyscience 恒温水浴槽; Zeiss 三角坐标仪; Schott A 级玻璃容量瓶。四水酒石酸钾钠、五水硫酸铜、氢氧化钠、碘化钾为 Sigma 高纯试剂, Millipore 超纯水。标准物质 SRM927d 购于美国国家标准技术研究院(NIST),使用前 2~8 ℃ 保存。新鲜冰冻人血清,无溶血、黄疸、脂血, TP 40~100 g/L, 共 40 份, 双份制备, 在测定前发送至评估实验室, -70 ℃ 保存, 测试前复融使用。RELA 国际比对样本由德国临床化学会(DGKL)提供, 包含 A、B 两个浓度水平, 2~8 ℃ 保存, 使用前以去离子水复溶。

1.2 TP 参考方法测量条件 参考测量程序中使用的紫外可

见分光光度计、分析天平、温度计、移液器等由省级计量部门鉴定合格,在试验前对其主要性能条件进行确认。

1.2.1 紫外可见分光光度计 采用国家标准物质,在标示标准波长下连续测量 10 次,计算均值与靶值偏倚及相对变异(CV%),评估吸光度准确度和重复性;使用三角坐标仪评估配套使用石英比色杯光径。

1.2.2 分析天平和移液器 连续称量标准 E2 级砝码 3 次,结果与标准值偏倚不大于 0.1 mg。使用称量法对 100.5 000 μL 量程移液器加水称重各 10 次,换算成室温条件下体积与标准体积比较,考察加样精密度和准确性。

1.2.3 试剂性能和检测参数 试剂按 Doumas TP 测定方法配制,540 nm 下双缩脲试剂空白吸光度应满足参考方法要求。

1.2.4 孵育时间优化 确认水浴温度可稳定在(25±1) ℃ 和(37±1) ℃,按测量程序分别在 25 ℃ 孵育 60 min 和 37 ℃ 孵育 10 min 条件下,分别测量 10 份新鲜人血清,结果进行 *t* 检验比较。

1.3 TP 参考方法性能评价

1.3.1 灵敏度 按测量程序重复测定已知浓度 SRM927d 溶液吸光度,计算分析灵敏度=A/C。

1.3.2 精密性 选择 4 份不同浓度新鲜人血清样本,每天进行 2 批测试,每批连续重复测定 5 次,连续测量 2 d,样本测试前使用 SRM927d 校准。

1.3.3 线性评价 以 SRM927d 为样本,改变测量程序,加样量分别为 0、40、80、120、160 μL 进行测定,各加样体积重复测定 2 次,按照公式: $A \times (5 + V_{\text{样本}}) / 5.1$,计算实际加样量下的吸光度(A:样本吸光度),并对结果与浓度进行回归计算。

1.3.4 准确度 在不同实验室按所建立方法测定 40 份人血清,各样本重复 2 次,比较室间结果差异,判定重复性。对 2009 年 TP 参考方法 RELA 比对样本 A、B 进行测定,连续 5 d,每天新鲜复溶测试样本后重复测定 4 次,计算并上报均值及不确定度。将在等效限内测试合格的各实验室样本 A、B 测试结果的均值、1s 和 2s 划线,评价测试结果是否在范围内。

1.4 结果不确定度评估 按 ISO 测量不确定度指南(GUM)进行 TP 参考方法测量结果不确定度评估^[5]。

2 结 果

2.1 TP 参考方法测量条件确定

2.1.1 紫外可见分光光度计性能确认 分别在 440、546、635 nm 波长下测定国家标准物质,各波长下实测结果 CV% 小于 0.02%,偏倚小于 1.0%。使用三角坐标仪测量石英比色杯透光面光径为 $(10 \pm 0.01)\text{mm}$,满足参考方法要求。

2.1.2 分析天平 and 移液器 电子分析天平称量 0.5、10 g 标准 E2 级砝码,重复 3 次,结果与标准值偏倚小于 0.005 g,在 0.5~10 g 范围内,称量准确性满足要求。100、5 000 μL 量程移液器 CV% 小于 0.5%,不准确度小于 0.3%,加样准确性和重复性满足参考方法要求。

2.1.3 试剂性能和检测参数 实验室人员按建立的测量程序标准操作规程熟练操作,540 nm 下测定配制的双缩脲试剂吸光度为 0.100 2,满足参考方法 0.095~0.105 的要求。

2.1.4 孵育时间优化 恒温水浴在设置的 25 $^{\circ}\text{C}$ 和 37 $^{\circ}\text{C}$ 下开机稳定后,温度波动在 ± 0.1 $^{\circ}\text{C}$ 以内,满足要求的温度范围。对 10 份新鲜人血清分别在 25 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 60 min 和 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min 条件下的测试结果见表 1,配对 t 检验显示结果无统计学差异($P > 0.05$),确认 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min 为孵育反应条件。

表 1 不同孵育温度及时间血清测试结果比较			
样本编号	25 $^{\circ}\text{C}$ 60 min	37 $^{\circ}\text{C}$ 10 min	相对偏倚(%)
1	48.8	48.8	-0.04
2	48.9	48.9	-0.04
3	64.4	63.7	-0.98
4	71.2	72.3	1.67
5	81.2	81.9	0.86
6	69.9	70.3	0.70
7	77.9	78.2	0.40
8	72.6	71.7	-1.23
9	74.9	74.5	-0.49
10	77.4	77.7	0.34
均值	68.7	68.8	0.12

2.2 TP 参考方法性能评价

2.2.1 灵敏度 按测量程序重复测定浓度 70.1 g/L 的 SRM927d,吸光度均值为 0.408,计算灵敏度为 0.005 82。

2.2.2 精密性 4 份不同浓度新鲜人血清样本连续检测 2 d,每天 2 批,共 20 次测试,结果表明方法不精密性(CV%)小于 0.7%,结果见表 2。

2.2.3 线性评价 以 SRM927d 为样本,改变测量程序加样量,得到修正样本吸光度与浓度,回归方程为 $Y = 0.005\ 82X - 0.000\ 16$, $r^2 = 0.999\ 83$,表明在 0~120 g/L 范围内线性良好,回归方程截距与零无统计学差异($P > 0.05$)。

2.2.4 准确度 迈瑞公司和北京航天总医院实验室按 TP 参

考方法测定相同的 40 份人血清样本,各样本重复 2 次取均值,实验室内各样本测定结果相对偏差在 $\pm 2.5\%$ 以内,在参考实验室室内能力评估等效限范围内。两家实验室均测定 2009 年 TP 参考方法国际比对 RELA 样本 A、B,测试结果在等效限内测试结果 1s~2s 范围内(原始数据见 <http://www.dgkl-rfb.de>:81)。

表 2 TP 参考方法精密性评价(n=20)		
样本	均值(g/L)	CV%
1	54.2	0.42
2	49.6	0.66
3	47.7	0.54
4	60.4	0.37

2.3 结果不确定度评估

2.3.1 被测量的技术规定 使用 SRM927d 为标准物质,移液器加样,自配双缩脲试剂,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下与待测样本进行反应,540 nm 波长下测量样本反应体系吸光度,以标准物质的反应吸光度为参考标准,计算待测样本 TP 浓度,计算公式为:

$$C_{TP} = \frac{A_t}{A_s} \times C_s$$

[CTP: TP 浓度(g/L); At: 待测样本反应吸光度; As: 标准溶液反应吸光度; Cs: 标准溶液浓度(g/L)]。

2.3.2 识别不确定度来源 根据 TP 参考方法测量条件、程序步骤和计算公式,分析明确影响测量不确定度的来源,主要包括:标准物质浓度,自配双缩脲试剂浓度,样本加样影响,反应温度,测量仪器性能,待测样本取样影响(如复溶时天平称量以及待测样本瓶间差)等,将可能因素绘制成因果关系图以助于对重要影响因素和遗漏因素的识别(图 1 见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。TP 参考方法中使用标准物质在相同波长下校准参考方法后再进行样本测试,其中比色杯、温度、试剂、检测波长等对于标准物质和样本条件均一致,其对测量结果不确定度影响很小,可以忽略,将各条件下重复性因素进行合并得到简化因果关系图(图 2 见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

2.3.3 量化不确定度 (1)被测样本测量重复性。根据重复测量 20 次测量标准差(复溶样本包括多瓶),重复性标准不确定度为 $SD/\sqrt{20}$,标准不确定度为 $U(r)$,相对标准不确定度 $urel(r) = U(r)/\text{量值}$,结果见表 3。(2)加样引入的不确定度。加样使用的移液器在仪器性能试验中其加样误差(偏倚)为 0.3%,按正态分布,样本和标准物质加样相对标准不确定度 $urel(s) = urel(st) = 0.003/\sqrt{3} = 0.001\ 73$,加样重复性已包括在测量重复性中,不再计算。(3)标准溶液标准值不确定度。标准物质 SRM927d 浓度为 $(70.1 \pm 0.74)\text{g/L}$, $k = 2$,标准值标准不确定度 $U(C_s) = 0.74/2 = 0.37$, $urel(C_s) = 0.427\ 3/70.1 = 0.005\ 28$ 。(4)样本和标准溶液测试吸光度不确定度。在分光光度计测量反应溶液吸光度,在仪器性能试验中,546 nm 吸光度测量误差(偏倚)在 0.6% 以内,故仪器吸光度标准不确定度 $urel(A_i) = 0.006/\sqrt{3} = 0.003\ 5$ 。参与结果计算的样本和标准溶液吸光度为修正值 $A_{\text{修正值}} = A_{\text{测试}} - A_{\text{样本空白}} - A_{\text{试剂空白}}$ 。因此,吸光度测量过程标准不确定度 $U(A) =$

$$\sqrt{[urel(A_i) \times A_{\text{测试}}]^2 + [urel(A_i) \times A_{\text{样本空白}}]^2 + [urel(A_i) \times A_{\text{试剂空白}}]^2}$$

相对标准不确定度 $urel(A) = U(A)/A_{\text{修正值}}$,结果见表 4。(5)样本复溶。待测样本 KSA 和 KSB 为冻干粉,在测试前使用 5 mL 移液器复溶,移液器在仪器性能评价中其加样误差(偏倚)为 0.3%,样本复溶引入不确定度 $urel(d) = 0.001\ 73$,计算相对合成标准不确定度和扩展不确定度用不确定度各分量的相

对不确定度平方和的根,求其相对合成相对标准不确定度 u_{rel} (C_{TP})。

$$u_{rel}(C_{TP}) = \frac{\sqrt{u_{rel}^2(r) + u_{rel}^2(s) + u_{rel}^2(st) + u_{rel}^2(C) + u_{rel}^2(A_{AKM}) + u_{rel}^2(A_{KS}) + u_{rel}^2(d)}}{C_{TP}}$$
待测样本扩展不确定度 $U(CTP) = k \times u_{rel}(C_{TP}) \times C_{TP}$, 包含因子 $k=2$, 待测样本 KSA, KSB 测量不确定度结果见表 5。

表 3 TP 重复性测量不确定度

样本	次数	量值(g/L)	SD	U(r)	urel(r)
KSA	20	47.7	0.257	0.057	0.001 203
KSB	20	60.4	0.224	0.050	0.000 828

表 4 样本和标准溶液 TP 反应吸光度不确定度

样本	A 修正值	标准不确定度	相对标准
		U(A)	不确定度 $u_{rel}(A)$
SRM	0.405	0.001 71	0.004 23
KSA	0.273	0.001 29	0.004 76
KSB	0.344	0.001 54	0.004 48

表 5 样本 TP 测量结果不确定度

样本	CTP(g/L)	相对标准	扩展不确定度
		不确定度 $u_{rel}(C_{TP})$	U(C_{TP})
KSA	47.7	0.008 9	0.85
KSB	60.4	0.008 7	1.05

3 讨 论

本研究建立 TP 参考方法,以实现常规检测系统的溯源性和性能评价。在进行参考方法试验前,应对易受环境或使用影响的和影响结果关键量的仪器设备进行校准或核查,以确认性能满足要求,并将其结果用于测量结果不确定度评估。实验室对仪器设备进行定期检定是不充分的,可能出现检定合格而某些关键量并不能满足参考方法的使用要求,同时也无法有效评估仪器设备的校准情况。

血清 TP 参考方法要求加样器不精密度不大于 0.3%,比色杯透光面光径为 (10 ± 0.01) mm,天平称量误差不超过 0.005 g,分光光度计波长为 (540 ± 1) nm,带宽小于 8 nm,反应温度波动 ± 1 °C^[3-4]。本研究在试验前对分光光度计、移液器、电子天平、比色杯子的关键性能进行了确认。分光光度计吸光度准确性和重复性对于测试结果的影响较为显著,作为主要贡献量体现在结果不确定度计算中。由于方法灵敏度为 0.005 82,则吸光度测量重复性极差不能大于 0.005,否则参与计算的样本反应吸光度(扣除试剂空白)将受到影响。因此,TP 参考方法应确保使用高精度分光光度计。Doumas 双缩脲方法中,样本反应条件设定为 25 °C 孵育 30 min,本试验对采用 37 °C 孵育 10 min 进行了确认,结果表明二者对多份血清样本的检测结果无统计学差异。37 °C 孵育温度与常规测试方法的温度要求一致,并能缩短反应时间,故采用该反应条件。

建立的 TP 参考方法需进行性能验证,以评估是否符合要求。对准确度的评估采用了室间比对和国际 TP 参考方法能力验证,以 JCTLM 对该项目的等效限作为接受指标。方法灵敏度是测量体系对单位浓度的反应吸光度,可换算表示成摩尔吸光系数,当在标准物质加样准确、试剂配制良好、光度计吸光度准确、比色杯光径符合要求的条件下得到的摩尔吸光系数应一致,可作为参考测量体系测量准确度评价指标之一。本研究测试得到摩尔吸光系数为 $0.296\ 8\ L \cdot g^{-1} \cdot cm^{-1}$,与 Doumas 评估试验 $(0.296\ 8 \pm 0.001\ 8)\ L \cdot g^{-1} \cdot cm^{-1}$ 报告一致^[4]。

每个完整的和可溯源的测量结果应附有合理评定的不确定度,ISO/IEC17025 和 ISO 15189 都对实验室的不确定度评定提出了相应要求^[6-7]。参考方法测量样本的不确定度是进行常规方法校准品不确定评估的重要来源之一,为常规临床检验对样本结果不确定度的评估提供依据。本研究按 GUM 评估原则^[5]对 TP 参考方法的重要影响量绘制成图进行分析和合并,将加样重复性、抽样瓶间差、光度计测量重复性等一并归入 A 类重复性计算,在 B 类分量的评估中使用了仪器性能确认中的校准数据,简化了测量结果不确定度分析过程,同时使评估数据来源较为合理有效。

综上所述,本实验室依据 JCTLM 推荐方法建立的血清 TP 参考方法,方法性能符合要求,测试结果通过 RELA 参考方法能力评估,同时建立了结果不确定度评估模型,可应用于后续检测试剂盒的标准化。

(志谢:本研究得到了杨振华教授,北京航天总医院检验科陈宝荣主任的大力支持,在此深表感谢!)

参考文献

[1] 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.

[2] 陈文祥,申子瑜,杨振华.临床生化检验参考方法的主要作用[J].中华检验医学杂志,2008,31(2):245-248.

[3] Doumas BT, Bayse DD, Carter RJ, et al. A candidate reference method for determination of total protein in serum; I. Development and Validation[J]. Clin Chem, 1981, 27(12):1642-1650.

[4] Doumas BT, Bayse DD, Carter RJ, et al. A candidate reference method for determination of total protein in serum; II. Test for Transferability[J]. Clin Chem, 1981, 27(12):1651-1654.

[5] ISO. Guide to the expression of uncertainty in measurement[M]. Geneva, Swiss; ISO, 1993.

[6] ISO, IEC. ISO/IEC 17025: 2005 General Requirements for the Competence of Calibration and Testing Laboratories[S]. Geneva, Swiss; ISO/IEC, 2005.

[7] ISO, DIS. ISO/DIS 15189 Quality management in medical laboratories[S]. Geneva, Swiss; ISO/DIS, 2000.

(收稿日期:2012-04-09)

(上接第 2192 页)

[6] 钟英强,黄花荣,魏菁.原发性肝癌和乙型肝炎肝硬化患者外周血淋巴细胞凋亡率、T 细胞亚群和 NK 细胞的水平变化和临床意义[J].胃肠病学和肝病杂志,2005,14(6):571-574.

[7] 何浩明,田小平,苏彩女.肝硬化患者淋巴细胞内腺苷脱氨酶活性的变化与 T 淋巴细胞亚群的关系[J].陕西医学检验,1992,14(1):5-6.

[8] Soldevila B, Alonso N, Martínez-Arconada MJ, et al. A prospective

study of T- and B-lymphocyte subpopulations, CD81 expression levels on B cells and regulatory CD4(+)CD25(+)CD127(low/-)FoxP3(+) T cells in patients with chronic HCV infection during pegylated interferon-alpha 2a plus ribavirin treatment[J]. J Viral Hepat, 2011, 18(6):384-392.

(收稿日期:2012-01-17)