

• 临床检验研究论著 •

不同添加剂对自制尿液室内质控物质量的影响*

袁咏梅, 何 亚, 王利军, 余素燕, 许瑞娜, 陈宝娜

(广州医学院附属深圳沙井医院检验科, 广东深圳 518104)

摘要:目的 为自制尿液复合型室内质控物选择最佳添加剂。方法 分析一种包含尿 N-乙酰-B-D-氨基葡萄糖苷酶(NAG)和尿微量清蛋白(UMA)两个项目的自制复合室内质控物的酶稳定剂、蛋白稳定剂及叠氮钠等添加剂对其稳定性及均一性的影响。结果 在-20℃保存温度下,尿 NAG 项目的稳定天数:无添加,72 d;叠氮钠,169 d;酶稳定剂,大于 365 d。同样条件下,尿 UMA 项目的稳定天数:无添加,99 d;叠氮钠,207 d;蛋白稳定剂,大于 365 d。质控物各个保存阶段稳定的同时测得的瓶间均一性良好。结论 在制备尿 NAG 和 UMA 两项复合室内质控物的同时添加酶稳定剂、蛋白稳定剂和叠氮钠能延长质控物的稳定时间,提高质控物的质量。

关键词:尿; 质控品; 稳定性; 均一性

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.15.007

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)15-1935-02

Effects of different additives on quality of self-made internal quality-control material for urine test*

Yuan Yongmei, He Ya, Wang Lijun, Yu Suyan, Xu Ruina, Chen Baona

(Department of Clinical Laboratory, Shenzhen Shajing Affiliated Hospital of Guangzhou

Medical University, Shenzhen, Guangdong 518104, China)

Abstract: Objective To choose the best additive for self-made internal QC mixture for urine detection. **Methods** Clinical fresh urine samples of kidney patients were collected and made into QC multiplex material for NAG and UMA measurements, then the homogeneity and stability were tested for quality control materials with different additives, which were enzyme stabilizer, protein stabilizer and sodium azide respectively. **Results** The number of stable days for NAG were 72 d(no additives), 169 d(sodium azide), >365 d(enzyme stabilizer), respectively. The number of stable days for UMA were 99(no additives), 207(sodium azide), >365(protein stabilizer). The homogeneity among samples was good. **Conclusion** Enzyme stabilizer, protein stabilizer and sodium azide can extend the stable days of self-made internal QC material for NAG and UMA measurements.

Key words: urine; quality-control material; stability; homogeneity

实验室自制质控物的难点是在一定时间内需要维持质控物的稳定与均一。而评价质控物质量的关键指标是稳定性^[1-2]。有研究报道,通过添加稳定剂、防腐剂、低温保存、容器封管等处理,能有效延长质控物的稳定期^[3]。本研究通过对加入了蛋白稳定剂、酶稳定剂、叠氮钠的质控物分别进行稳定性和均一性检测及比较,观察各添加剂对自制质控物的质量的影响。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂 美国进口的贝克曼-库尔特 DXC800 全自动生化分析仪。尿尿 N-乙酰-B-D-氨基葡萄糖苷酶(NAG)和尿微量清蛋白(UMA)试剂与校准品由宁波美康生物科技股份有限公司生产。

1.2 方 法

1.2.1 质控物的配制 (1)收集尿 NAG>50 U/L,UMA>60 mg/L(HBSAG 阴性,HCV 抗体阴性,HIV、梅毒阴性)的足量尿液;(2)离心后取上清液经 0.22 μm 滤膜过滤除菌后,分成 5 份,其中第 1 份不添加任何添加剂,第 2、3、4 份分别加入酶稳定剂,蛋白稳定剂及适量叠氮钠,第 5 份加入上述 3 种添加剂;(3)充分混匀,吸取混合液按样本检测,符合预期效果后按每支 200 μL 的规格分装(分装容器均已用小牛血清封闭过),密封胶封口。

1.2.2 质控物的保存与稳定性检测 将配制的 5 份质控物保存于-20℃条件下备用。把制备的上述 5 份室内质控物各取 1 支作为样本进行检测,每天 1 次,于上午 9:00 完成;严格按各种检测试剂的操作说明书进行操作和结果判断。结果判断依据:测定值超过 $\bar{x} \pm 3s$ 质控限,即判断为失控。如质控结果为一直在控,则继续使用该质控品直至用完为止;如期间出现失控,经失控原因分析确认质控物变质失效后停止对该份质控物的检测,此实验持续观察一年。

1.2.3 瓶间均一性的测定 每份质控物分装后即刻随机抽取 10 管,先按 1 到 10 的顺序检测,再从 10 到 1 的顺序重复测定,所得两次检测结果取其均值,计算 CV% 值。在-20℃温度下保存的质控物,每 3 个月检测一次,抽样检测与“即刻”相同,计算出每次抽样检测的 CV% 值,并与即刻 CV% 值比较。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计学软件进行数据分析, CV% 的比较采用 *t* 检验, *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 稳定性实验 加入不同添加剂后,-20℃保存条件下不同质控项目的稳定天数,见表 1。

2.2 瓶间均一性实验结果 加入不同添加剂后,-20℃保存条件下,不同保存时间,尿 NAG 项目的不精密度,见表 2,差异无统计学意义(*P*>0.05);不同保存时间,尿 UMA 项目的不

* 基金项目:2012 年深圳市宝安区科技计划项目(2012135)。 作者简介:袁咏梅,女,副主任医师,主要从事临床生物化学与检验研究。

精密度,见表 3,差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 1 加入不同添加剂后各质控项目的稳定天数(d)

项目	无添加	加入叠氮钠	加入酶稳定剂	加入蛋白稳定剂	三种均加入
NAG	72	169	>365	83	>365
UMA	99	207	104	>365	>365

表 2 不同添加剂的质控物尿 NAG 检测在的不精密度(CV%)

保存时间	无添加	加入叠氮钠	加入酶稳定剂	加入蛋白稳定剂	三种均加入
即刻检测	5.23	5.24	5.26	5.30	5.19
3 月	—	5.36	5.27	—	5.30
6 月	—	—	5.37	—	5.45
9 月	—	—	5.34	—	5.49
12 月	—	—	5.39	—	5.48

—:无数据。

表 3 每份质控物中尿 UMA 在 -20℃ 保存下的不精密度(CV%)

保存时间	无添加	加入叠氮钠	加入酶稳定剂	加入蛋白稳定剂	三种均加入
即刻检测	4.20	4.29	4.29	4.26	4.15
3 月	4.29	4.36	4.37	4.30	4.26
6 月	—	4.42	—	4.29	4.27
9 月	—	—	—	4.37	4.32
12 月	—	—	—	4.39	4.30

—:无数据。

3 讨论

疾病的诊断不仅依靠临床症状和体征,也需要检验科的密切配合,以患者为中心就必须以质量为核心,为患者提供安全有效的服务^[4]。实验室实现全面质量监控是提高检验结果准确性,这是为患者提供优质服务的保证。生化室内质控是由实验室的工作人员采用一系列统计学的方法,连续地评价本实验室测定工作的可靠程度,判断检验报告是否可发出的过程^[5]。目前,随着实验室质量控制的加强,大部分生化常规检验项目都有了商品化的室内质控物,然而也有一些非常规检测项目,例如尿 NAG 和 UMA 质控物,因为研制过程较烦琐,耗费时间较长,需求量相对较少,市面上难以找到合适的室内质控物,所以导致这部分检测项目无法实施室内质控,造成实验室质量监控中的空白。有研究报道,尿液 NAG、UMA 与血肌酐、胱抑素 C 及视黄醇结合蛋白(RBP)等多项联合检测,对早期糖尿病肾损、高血压早期肾损、妊娠高血压、窒息新生儿早期肾损的早期诊断能提供可靠的诊断依据^[6-10]。本实验室有成功研制生化室内质控物的经历,本研究旨在研制出一种包含尿 NAG 和尿 UMA 两个项目的复合质控物,该质控物应该具备良好的均一性,且在一定的保存温度及时间内应具备良好的稳定性。

本研究中,用于质控物研制的材料选自临床肾病患者尿液,如何维持质控物稳定是此次研究的关键。所以如何选择最适添加剂增加质控物的稳定性,是本研究的一个重点。李顺君等^[11]用乙二醇作为稳定剂制备液态尿液质控具有可接受的稳定性,瓶间差较小。彭小丽等^[12]采用含防腐功能的洗涤液直接稀释尿液提取物制成质控物,再加以庆大霉素,确保质控物

各有形成分浓度的稳定。本研究选择了叠氮钠、酶稳定剂和蛋白稳定剂作为添加剂并分别进行质控物稳定性和均一性实验,通过对加入了不同添加剂的 5 组质控物进行观察,分析酶稳定剂和蛋白稳定剂及叠氮钠等添加剂对其稳定性及均一性的影响。结果显示,在 -20℃ 保存下,未添加任何稳定剂和防腐剂的质控物稳定时间最短,加入叠氮钠抑菌的质控物稳定期延长为未加任何稳定剂和防腐剂的质控物的 2.34 倍(NAG)和 2.09 倍(UMA),同时加入酶稳定剂和蛋白稳定剂及叠氮钠的质控物稳定期最长,在 -20℃ 保存观察一年其稳定性未见明显下降,因本次研制的质控物数量原因,对于此质控物在大于 365 d 后多长时间内能继续保持稳定,本实验未能做进一步研究。

添加剂对质控物均一性的影响检测采用 ANNOV 方式,ANNOV 方式是抽取有代表性的样本数,每瓶重复测量 2~3 次;本研究中每份质控物分装后立即随机抽取 10 管,先按 1 到 10 的顺序检测,再从 10 到 1 的顺序重复测定,所得两次检测结果取其均值,计算 CV% 值。然后把每份质控物放于 -20℃ 温度下保存,每 3 个月检测一次,抽样检测与“即刻”相同,计算出每次 CV% 值与即刻 CV% 值比较。这样就可以得到多个数据,并充分了解质控物在各个阶段均一性变化。按卫生部临床检验中心文件《临床化学质控血清一般技术要求》中关于瓶间差的要求:“酶项目 CV 小于 2 倍,其他项目小于 1 倍,经存放后不稳定物的 CV 不能超出原来的 1.5 倍”,自定室内质控 CV 值应控制在 10% 以内。从表 2 和表 3 可以看出,5 组加入不同添加剂的质控物的瓶间差均在准许范围,其批间变异和批内变异在统计学上无明显差异,瓶间差小。结果显示,在质控物稳定期内,质控物能保持良好的均一性。上述稳定性与均一性实验结果表明:在制备尿 NAG 和 UMA 两项复合室内质控物的同时添加酶稳定剂,蛋白稳定剂和叠氮钠能延长质控物的稳定性,提高质控物的质量。

实验过程中发现,维持质控物稳定性的重要手段除加入防腐剂抑菌,加入稳定剂延长质控物的稳定期,还有配制器材除菌也很重要。本实验所用的配制、装载质控物的容器均经过灭菌处理,收集的标本经 0.22 μm 滤膜过滤除菌,这些措施有效延长了质控物的稳定期。本实验所用的分装容器均已用小牛血清封闭过,分装后用密封胶封口,使其能在更长的时间内维持质控物的稳定。本研究对自制尿液复合型室内质控物添加剂的选择进行了实验,为后续的进一步实验提供了参考依据,在以后的实验中,还应不断积累经验,完善质控工作,提高临床生化检验质量。

参考文献

- [1] 黎卓华,李鄂,王希平,等. 自制类风湿因子质控品的应用及其质量的监控作用评价[J]. 国际检验医学杂志,2007,28(9):860-861.
- [2] 许华斌,李媛媛. 血细胞质控品开封后的稳定性研究[J]. 国际检验医学杂志,2009,30(5):456-458.
- [3] 刘和录,许瑞娜,余素燕,等. 5 种定性试验质控物的研制与应用[J]. 国际检验医学杂志,2012,33(5):589-590.
- [4] 王卓,龚严. 检验信息管理系统在肝功能检测中的应用[J]. 实用医技杂志,2005,12(12):1663-1664.
- [5] 侯艺,郭楠. 临床生物化学室内质控的失控情况处理及原因分析和纠正方法[J]. 实用医技杂志,2007,14(7):871-872.
- [6] 刘光华. 尿 NAG、血 SCr 对早期糖尿病肾病的诊断价值[J]. 中国当代医药,2012,19(15):79-81.
- [7] 王巍巍,刘艳芳. 尿生化指标检测在肾功能早期(下转第 1938 页)

少量棘层细胞有染色,阳性染色主要位于胞质(图 2);角蛋白 2e 在正常皮肤组织及 IV 皮损组织的阳性染色 PU 值分别为 $0.216 8 \pm 0.018 0$ 及 $0.153 7 \pm 0.009 7$;IV 皮损组织阳性染色 PU 值明显低于正常皮肤组织($t = -11.05, P < 0.000 1$)。

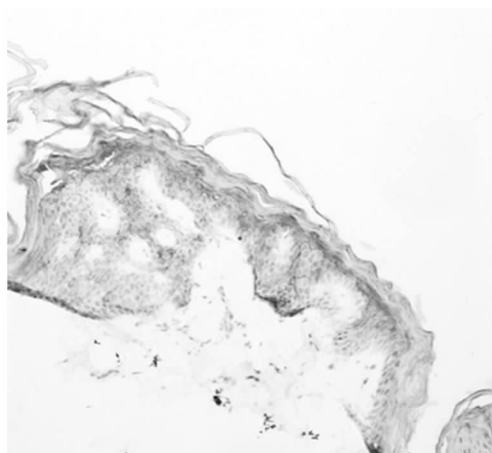


图 1 正常皮肤组织中角蛋白 2e 的免疫组化染色(DAB 法,×100)

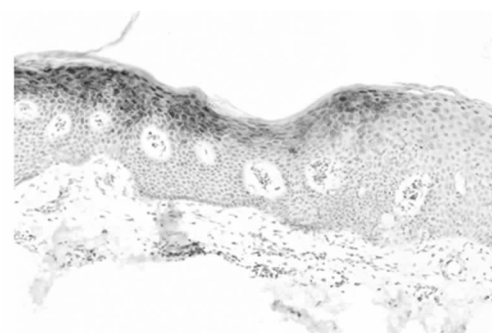


图 2 IV 皮损组织角蛋白 2e 的免疫组化染色(DAB 法,×100)

3 讨 论

皮肤的正常角化过程是从表皮基底层细胞开始逐步向表皮外层分化成棘层细胞、颗粒层细胞、角层细胞。基底层位于表皮的最深处,与真皮相连,表皮的生成正是从基底层细胞的有序增殖开始的,基底层细胞在增殖过程中不断地向表面移动。在向表面移动分化过程中,基底细胞逐渐丧失其增殖能力,从而完成了角质形成细胞从有生命细胞到无生命细胞即角质细胞的转变^[6-8]。在皮肤角化过程中 2 个表皮特异性复合体家族起主要作用:第一个家族编码细胞角质化包膜的前体蛋白,组成编码人类表皮的结构蛋白,包括内皮蛋白,兜甲蛋白等^[1,7-8];第二个家族编码位于表皮颗粒层的中间丝相关蛋白,在表皮角化过程中与角质形成细胞的角蛋白丝相结合,包括角蛋白、中间丝聚蛋白,毛透明蛋白(trichohyalin)^[9-10]。IV 患者临床存在皮肤屏障功能障碍,IV 病理显示角质层中度角化过

度,颗粒层变薄或消失。电镜示透明角质颗粒数量减少且结构异常。FLG 基因突变与 IV 及特应性皮炎发病有关,特应性皮炎患者皮肤亦存在皮肤屏障功能障碍,可能与其 FLG 蛋白表达下降有关^[8],提示表皮特异性复合体与皮肤屏障功能密切相关。角蛋白 2e 属于表皮特异性复合体的成员,角蛋白 2e 基因突变是板层状鱼鳞病的致病因素。角蛋白 2e 在 IV 患者皮损标本中的表达如何,是否与鱼鳞病有关,国内尚未见到相关报道。

本研究发现角蛋白 2e 在正常皮肤组织中弥漫分布于表皮角质层、颗粒层、棘层及基底层细胞,阳性染色主要位于细胞质内,胞核未见染色,染色从颗粒层向基底层细胞扩散延伸,染色强度有所减弱;在 IV 皮损组织中,角蛋白 2e 在 IV 皮损中分布于表皮角质层及颗粒层,棘层细胞少量染色,基底层细胞未见染色,阳性染色主要位于胞质内。角蛋白 2e 在 IV 皮损组织的染色强度均明显低于正常组织。IV 患者皮肤屏障功能障碍,临床表现为皮肤干燥、剧烈瘙痒、易合并哮喘、过敏性鼻炎、特应性皮炎、毛周角化等症状。本研究结果提示表皮角蛋白 2e 表达减少与 IV 患者的皮肤屏障功能受损有关。

参考文献

- [1] Wells RS, Kerr CB. Genetic classification of ichthyosis[J]. Arch Dermatol, 1965, 92(1): 1-6.
- [2] Digiiovanna JJ, Robinson-Bostom L. Ichthyosis: etiology, diagnosis, and management[J]. Am J Clin Dermatol, 2003, 4(2): 81-95.
- [3] 李常兴,李雪梅,张锡宝,等.汉族寻常型鱼鳞病丝聚蛋白基因突变的研究[J].中国麻风皮肤病杂志,2011,27(2): 90-92.
- [4] 韩春雷,孙澍彬,李常兴,等.寻常型鱼鳞病一家系 Filaggrin 基因突变检测[J].中国皮肤性病学杂志,2011,25(9): 681-683.
- [5] Li CX, Luo Q, Li XM, et al. Filaggrin mutations are associated with ichthyosis vulgaris in the Southern Chinese population[J]. Health(Irvine Calif), 2010, 2(12): 1345-1348.
- [6] Presland RB, Boggess D, Lewis SP, et al. Loss of normal profilaggrin and filaggrin in flaky tail(ft/ft) mice: an animal model for the filaggrin-deficient skin disease ichthyosis vulgaris[J]. J Invest Dermatol, 2000, 115(6): 1072-1081.
- [7] 刘玮.皮肤屏障功能解析[J].中国皮肤性病学杂志,2008,22(12): 758-761.
- [8] 李常兴,李雪梅,张锡宝,等.中间丝聚蛋白在特应性皮炎患者皮损中的表达[J].皮肤性病诊疗学杂志,2012,19(5): 279-281.
- [9] 李常兴,李雪梅,张锡宝,等.南方汉族人特应性皮炎中间丝聚蛋白基因多态性检测与分析[J].中华医学遗传学杂志,2011,28(5): 572-574.
- [10] Smith FJ, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, et al. Loss-of-function mutations in the gene encoding filaggrin cause ichthyosis vulgaris[J]. Nat Genet, 2006, 38(3): 337-342.

(收稿日期:2013-04-13)

(上接第 1936 页)

改变中的诊断价值[J].实用预防医学,2012,19(4): 601-603.

- [8] 陆小梅,黎四平,邹建铭.联合检测尿微量清蛋白、转铁蛋白和 α-微球蛋白在窒息新生儿早期肾损伤的应用价值[J].中国实验诊断学,2012,16(3): 436-443.
- [9] 刘敏.血清清蛋白、尿微量清蛋白在妊高征患者中表达和临床诊断意义[J].中国实验诊断学,2012,16(1): 93-94.
- [10] 陈华丽,杨文东,韩景银.尿 mAlb 与 NAG 联合检测对原发性高

血压早期肾损伤的诊断价值[J].实用医技杂志,2006,13(13): 2233-2234.

- [11] 李顺君,黄文方,饶绍琴,等.探讨制备尿液微量蛋白质控液[J].现代检验医学杂志,2003,18(2): 46-47.
- [12] 彭小丽,冯春颜,吴文权.全自动尿沉渣分析仪质控物的研制及其应用[J].现代医院,2007,7(2): 53-54.

(收稿日期:2013-04-08)