

· 论 著 ·

血清丙氨酸氨基转移酶检测的临床可报告范围的建立及评价

陈 群, 罗文沈, 吴愿如, 吴雪梅

(深圳市龙岗区第二人民医院检验科, 广东深圳 518112)

摘要:目的 分析德赛诊断试剂采用 Beckman Dxc800 生化仪检测血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)的灵敏度(FS)、最大允许稀释度(MAD)、分析测量范围(AMR)等,并建立 ALT 临床可报告范围(CRR),为临床提供可靠检测结果。方法 参照美国临床和试验室标准化协会(CLSI)EP6-A 文件,选用覆盖厂家声明 AMR 的高、低值患者混合标本配制系列等间距不同浓度标本进行 ALT 重复测定 2 次,应用 SPSS19.0 统计软件进行 AMR 多项式回归分析;选用 5 份较低浓度标本进行日间重复测定 ALT,以相应的变异系数与检测均值关系确定 FS;选用 3 份高浓度 ALT 标本用生理盐水进行不同倍数稀释后再测定,计算回收率,确定 MAD,并结合 FS 建立 CRR。结果 应用德赛诊断试剂采用 Beckman Dxc800 生化仪检测血清 ALT 的 AMR 为 5.50~847.50 U/L,FS 为 3.698 U/L,MAD 为 1:8,CRR 为 3.698~6 780.000 U/L。结论 应用德赛诊断试剂采用 Beckman Dxc800 生化仪进行血清 ALT 检测的 AMR 较厂家声明的宽;所建立的 CRR 可满足临床常规需要。

关键词:丙氨酸转氨酶; 评价研究; 临床可报告范围

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.03.031

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)03-0362-03

Establishment and evaluation on the clinical reportable rang of serum alanine aminotransferase

Chen Qun, Luo Wenshen, Wu Yuanru, Wu Xuemei

(Department of Clinical Laboratory, the Second People's Hospital of Longgang, ShenZhen, Guangdong 518112, China)

Abstract: Objective To explore the functional sensitivity, maximum allowable dilution, analytical measurement range and clinical reportable rang of the serum alanine aminotransferase (ALT) detected by Beckman Dxc800 automatic analyzer with the DiaSys diagnostic biochemistry reagent kits. **Methods** According to the EP6-A document published in 2004 by American Clinical and Laboratory Standards Institution (CLSI), these samples with equal interval, proportional prepared with the low levels serum and the high levels serum and their concentration exceeding the range claimed by manufacture, were detected twice each. The results were registered and analyzed by the SPSS19.0 statistic software with polynomial regression analysis to determine the analytical measurement range. Five samples at the low concentration, which were prepared previously, were detected repeat at day interval. And the functional sensitivity was determined with combining the coefficient of variation and the average value. Three samples, diluted to different dilution ratio with physiological saline, were detected. The dilution recovery rate, which was required in the range of 90% - 110%, was calculated to establish the clinical reportable rang by combining the Functional Sensitivity. **Results** The analytical measurement range of the serum ALT detected by Beckman Dxc800 analyzer was 5.50 - 847.50 U/L, the functional sensitivity was 3.698 U/L, the maximum allowable dilution was 1:8 and the clinical reportable rang was 3.698 - 6 780.0 U/L. **Conclusion** The analytical measurement range of the serum ALT detected by Beckman Dxc800 analyzer with the DiaSys diagnostic biochemistry reagent kits, was wider than that of being claimed by manufacture, the clinical reportable rang could meet the need of clinic.

Key words: alanine aminotransferase; evaluation study; clinical reportable rang

根据国际标准化组织颁布的《医学实验室质量和能力的专项要求》(ISO15189)和中国《医疗机构临床实验室管理办法》,对自建系统的主要方法学性能应进行验证或评价,证实其能达到相应标准后才能用于临床检测。定量检测项目需进行方法学验证试验,包括准确度、精密性、灵敏度(FS)、特异度、可报告范围(CRR)和参考区间等^[1]。本研究主要参照美国临床和试验室标准化协会(CLSI)EP6-A 文件和文献[2-4]对本试验室检测血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)的自建系统的 FS、最大允许稀释度(MAD)、分析测量范围(AMR)进行研究,并由此建立 CRR,现报道如下。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂 Beckman Dxc800 生化分析仪、德赛 ALT 生化试剂(批号 07120/00001206)和校准品(591009910064)、Randox 质控品(批号 27601、27602)等。

1.2 试验操作及标本要求 对各种试验、仪器均严格遵守各项标准操作规程操作。确保仪器处于良好状态。应用 Beckman Dxc800 生化分析仪,使用德赛 ALT 生化试剂,经校准并

质控在控。试验所用标本均来本院临床科室,要求新鲜、胆红素小于 684 $\mu\text{mol/L}$ 、无脂浊及溶血。

1.3 AMR 试验 参照 CLSI EP6-A 文件,收集高 ALT 水平患者混合血清,要求超过厂家线性范围 20%~30%,离心后取上清液作为高值标本(H);以同样方法收集低 ALT 水平患者混合血清作为低值标本(L)。将 H 和 L 按 20L+0H、19L+1H、18L+2H、17L+3H、16L+4H、15L+5H、14L+6H、12L+8H、10L+10H、8L+12H、6L+14H、5L+15H、4L+16H、3L+17H、2L+18H、1L+19H、0L+20H 的配比关系配制得到 17 份试验标本(A1~17)。每份标本重复测定 2 次。记录检测结果。各种操作标本采集后 1 d 内完成。

1.4 FS 试验 收集 5 个低浓度标本分别标记为 B1~5(接近厂家线性范围下限,B1 经 56 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 60 min 处理),然后分装,-21 $^{\circ}\text{C}$ 保存;每天 1 批,每批重复测定 2 次,连续测定 10 d。FS 指日间重复变异系数(CV)为 20%时对应检验限样品具有的平均浓度。

1.5 MAD 及 CRR 试验 收集 3 个高浓度标本(C1~3),用

生理盐水分别进行 2、4、8、16 倍稀释,然后进行检测。记录实测值。计算稀释回收率(稀释后实测值×100%/稀释后预期值),在 90%~110% 范围内确定 MAD。CRR 指患者标本经稀释、浓缩或其他处理后向临床所能报告的结果范围。CRR 下限为 FS,上限为 AMR 上限×MAD。

1.6 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行重复性误差和多项式回归分析^[5-6]。设定重复性和线性允许误差分别为 5% 和 10%。重复性误差分析公式:

$$CVr = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^L (Ri1 - Ri2)^2}{2 \times L}}$$

$i = A1, A2, \dots, A17, Ri1, 2$ 为单次测量结果与测量均值百分比, L 为标本总数。以 CV 为 X 轴、检测均值为 Y 轴进行多项式回归分析,根据最适回归方程确定 FS。

2 结 果

2.1 AMR 试验结果 A1~17 标本检测 $CVr = 2.46\%$, $< 5\%$ 设定目标。以加入 H 相对量为 X 与实测均值为 Y 进行多项式回归分析得最适多项式为二次,与一次方程偏倚分析中 A1、A2 点超过设定 10% 允许偏差,在 5.500~858.000 U/L 呈非线性。经绘制散点图观察到 A17 点存在明显偏差后舍弃该点再进行回归修正分析得直接判断为线性,见图 1。最适为一次多项式 $Y = 44.687X + 4.874$,确定 AMR 为 5.500~847.500 U/L。A1~A17 标本检测结果见表 1。

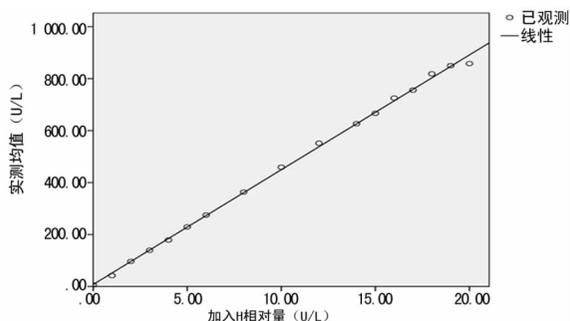


图 1 以 H 相对加入量为 X 轴与实测均值为 Y 轴绘制的散点图

表 1 A1~17 标本检测结果(U/L)

试验标本	测量结果 1	测量结果 2	测量均值	差值
A1(20L+0H)	5	6	5.50	-1
A2(19L+1H)	43	41	42.00	2
A3(18L+2H)	95	98	96.50	-3
A4(17L+3H)	141	138	139.50	3
A5(16L+4H)	182	176	179.00	6
A6(15L+5H)	227	232	229.50	-5
A7(14L+6H)	278	272	275.00	6
A8(12L+8H)	365	362	363.50	3
A9(10L+10H)	453	465	459.00	-8
A10(8L+12H)	548	555	551.50	-7
A11(6L+14H)	631	622	626.50	9
A12(5L+15H)	670	663	666.50	7
A13(4L+16H)	722	728	725.00	6
A14(3L+17H)	760	752	756.00	8
A15(2L+18H)	815	822	818.50	-7
A16(1L+19H)	851	844	847.50	7
A17(0L+20H)	853	863	858.00	-10

2.2 FS 试验结果 将 B1~5 标本重复检测的 $CV(\%)$ 与实测均值作回归分析得出最适方程为 $Y = -0.226X + 8.218$ 。将 20% 代入该方程得出 FS 为 3.698 U/L。B1~5 标本检测结果

见表 2。

表 2 B1~5 标本检测结果

试验标本	实测均值(U/L)	标准差	CV(%)
B1	1.5	0.468	31.20
B2	4.0	0.684	17.10
B3	5.0	0.560	11.20
B4	6.5	0.515	7.92
B5	8.0	0.293	3.66

2.3 MAD 及 CRR 试验结果 用生理盐水作稀释介质时确定的 MAD 为 1 : 8, C1~3 标本检测结果见表 3。结合 FS 为 3.698 U/L, AMR 上限为 847.500 U/L, MAD 为 1 : 8, 确定 CRR 为 3.698~6 780.000 U/L。

表 3 C1~3 标本检测结果

试验标本	实测值(U/L)	预期值(U/L)	稀释回收率(%)
C1(965 U/L)			
1 : 2	505	482.50	104.66
1 : 4	257	241.25	106.53
1 : 8	131	120.63	108.60
1 : 16	70	60.31	116.07
C2(1 052 U/L)			
1 : 2	544	526.00	103.42
1 : 4	277	263.00	105.32
1 : 8	142	131.50	107.98
1 : 16	78	65.75	118.63
C3(1 208 U/L)			
1 : 2	616	604.00	101.99
1 : 4	314	302.00	103.97
1 : 8	164	151.00	108.61
1 : 16	85	75.50	112.58

3 讨 论

众所周知, ALT 是一项主要反映肝功能受损的灵敏指标, 轻微肝损伤即可明显升高。临床很多肝脏疾病均可导致血清 ALT 明显升高, 时常会超过 1 000 U/L, 甚至超出现有测定方法的测量范围。故对 ALT 检测系统分析性能的验证分析非常重要。目前, 关于参考 CLSI-EP 系列文件, 使用德赛诊断生化试剂采用 Beckman Dxc800 生化分析仪进行血清 ALT 检测的自建系统的分析性能验证和评价研究较少见, 特别是临床可报告范围的建立和分析相关文献报道更为罕见。而该分析性能是广大检验工作者最终能否向临床发出可靠检验报告的重要指标之一。

本研究在 AMR 建立的研究中参照 CLSI-EP6-A 文件要求, 采用了由高值和低值混合标本按比例配成的覆盖厂家声明分析测量范围(4~550 U/L) 的 17 份等间距的不同浓度标本, 在所得数据线性偏倚分析中发现, A1、A2 点偏倚超过设定 10% 允许偏差, 说明其引入的误差不能被接受。经绘制散点图直接观察到 A17 点存在明显线性偏倚, 去掉 A17 点进行修正回归处理得出最适为一次方程, 在 A1~16 点范围内呈线性, 从而确定 AMR 为 5.50~847.50 U/L, 较(下转第 366 页)

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,孔蕴莲,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)