

尿微量清蛋白(mALB)五种非线性校准方法研究及测量偏倚分析*

张杰良, 邓文成, 梁映亮, 徐 宁, 莫和国 (南方医科大学附属小榄医院检验科, 广东中山 528415)

摘要:目的 探讨尿微量清蛋白(mALB)的五种非线性校准方法的差异与特征,并确定其最合适校准曲线。方法 分别采用对数函数(Logit-log3P, Logit-log4P, Logit-log5P)、样条函数(Spline)及多元折线函数(Line-Graph)五种校准方法对mALB进行校准,同时检测卫生部临床检验中心5个批号的室间质评物质,记录相关校准参数并对检测结果进行测量偏倚分析。结果 五种校准方法的测量偏倚与平均秩次由小到大排序分别为 Line-Graph(9.6%, 7.5), Logit-log5P(12.0%, 9.5), Spline(11.7%, 11.8), Logit-log4P(13.2%, 15.4), Logit-log3P(18.8%, 20.8);五种校准方法测量偏倚差异有统计学意义($\chi^2=10.208, P<0.05$)。结论 多元折线函数(Line-Graph)校准方法测量偏倚与平均秩次最小,为 mALB 的最合适的校准曲线。

关键词:尿微量清蛋白;非线性校准;测量偏倚

中图分类号:R446.112 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2015)06-101-03

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2015.06.030

Research of Five Nonlinear Calibration Methods and Analysis of Measurement Bias of Urine Microalbumin

ZHANG Jie-liang, DENG Wen-cheng, LIANG Ying-liang, XU Ning, MO He-guo

(Department of Clinical Laboratory,

Xiaolan Hospital of Southern Medical University, Guangdong Zhongshan 528415, China)

Abstract: **Objective** To investigate the differences and characteristics of the five nonlinear calibration methods so that ascertain the most suitable calibration curve of Urine Microalbumin. **Methods** Respectively adopted the five nonlinear calibration methods of the logarithmic functions (Logit-log3P, Logit-log4P, Logit-log5P), the spline function (Spline) and the multi line function (Line-Graph) to calibrate the mALB and testing the quality control materials of EQA simultaneously. Recorded the calibration parameter of mALB and analysed the measurement bias of test results. **Results** According to the measurement bias and the mean rank of the calibration methods, the results of the research were Line-Graph(9.6%, 7.5), Logit-log5P(12.0%, 9.5), Spline(11.7%, 11.8), Logit-log4P(13.2%, 15.4) and Logit-log3P(18.8%, 20.8). There were significant differences in the measurement bias of the five calibration methods ($\chi^2=10.208, P<0.05$). **Conclusion** The multi line function (Line-Graph) was the most suitable calibration curve of Urine Microalbumin for its minimum measurement bias and mean rank.

Keywords: urine microalbumin; nonlinear calibration; measurement bias

非线性校准是利用多个浓度的标准物质在特定的波长下,测定出各自的吸光度值,利用不同的浓度和所测得的吸光度值之间的关系,绘制成非线性的标准曲线^[1]。自动生化分析仪对于非线性校准的检测项目通常提供了多种校准方法,而检测试剂盒说明书对于项目校准通常只是描述使用非线性校准方法,并没有明确阐述使用何种非线性校准,即最合适校准曲线;这不仅给检测项目校准参数设置带来困难,同时也影响了检验结果的准确性,为临床诊断带来不确定性。因此,本研究对尿微量清蛋白(mALB)检测试剂分别采用了五种多点非线性函数方法进行校准,并通过对卫生部临床检验中心室间质评物质进行测量偏倚分析,以确定

该项目在仪器上的最佳校准曲线。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 采用日立 7180-ISE 型自动生化分析仪进行样品检测;mALB 检测试剂盒及配套 6 个浓度校准品均由英国朗道公司提供;室间质评物质为卫生部临床检验中心 2015 年全国尿液定量生化室间质量评价物质(批号:201511~201515)。

1.2 方法

1.2.1 建立校准曲线与校准参数:依据 mALB 检测试剂说明书设置好检测参数与校准参数后,分别采用对数函数(Logit-log3P, Logit-log4P, Logit-log5P)、样条函数(Spline)及多元折线函数(Line-

* 作者简介:张杰良(1982-),男,学士,主管检验技师,主要从事临床生物化学检验,E-mail:zjl20020828@163.com。

通讯作者:莫和国,E-mail:945161386@qq.com。

Graph)五种非线性校准方法对 mALB 进行校准;校准完成后仪器自动生成对应的校准曲线及相关的校准参数,后者包括 S1 ABS,K 值,a,b 与 c 等。S1 ABS 为第一标准品吸光度(试剂空白);K,a,b 和 c 为校准曲线非线性检量近似式常数。

1.2.2 测量偏倚计算:在每种校准方法校准通过并生成对应的校准曲线与校准参数后,立即对 5 个批号的室间质评物质进行重复检测两次,并将检测结果的平均值分别与对应批号的质评物回报靶值

进行比较,计算出每个批号的测量偏倚及五种校准方法平均偏倚(\bar{x})与标准差(s)。

1.3 统计学分析 采用 SPSS13.0 软件对五种校准方法的测量偏倚进行 K Independent Samples Test 统计学分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 尿微量清蛋白五种校准方法检测结果均值与卫生部室间质评回报靶值的比较及统计学分析 见表 1。

表 1 尿微量清蛋白五种校准方法测量偏倚及统计学分析(mg/L)											
室间质评物		Logit-log3P		Logit-log4P		Logit-log5P		Spline		Line-Graph	
批号	靶值	均值	偏倚(%)	均值	偏倚(%)	均值	偏倚(%)	均值	偏倚(%)	均值	偏倚(%)
201511	102.5	85.3	-16.8	87.4	-14.8	86.4	-15.7	85.55	-16.6	88	-14.2
201512	30.2	24.0	-20.7	25.3	-16.2	26.75	-11.4	26.6	-11.9	26.75	-11.4
201513	49.3	39.4	-20.2	40.9	-17.0	43.75	-11.3	42.95	-12.9	44.45	-9.8
201514	353.8	304.1	-14.1	354.05	0.1	377.65	6.7	348.8	-1.4	353.4	-0.1
201515	68.8	53.6	-22.1	56.4	-18.0	58.7	-14.7	57.85	-15.9	60.25	-12.4
$\bar{x}\pm s$		18.8±3.3		13.2±7.4		12.0±3.5		11.7±6.1		9.6±5.5	
χ^2_P				10.208		0.037					
Mean Rank		20.8		15.4		9.5		11.8		7.5	

注:“ $\bar{x}\pm s$ ”为偏倚(%)绝对值的平均值与标准差,“Mean Rank”为平均秩次。
2.2 在 Calibration Information 或 Calibration List 中分别显示了五种校准方法的 S1 ABS(B),K 值,a,b 与 c 中的一个或多个参数。仪器在校准完

成后自动生成对应曲线与相关参数,通过这些参数与对应的计算公式可以计算待检样本的浓度 见表 2。

表 2 尿微量清蛋白五种校准方法的样品浓度计算公式及相关校准参数		校准参数					s
校准方法	计算公式	S1 ABS(B)	K	a	b	c	
Logit-log3P	$C_x = \frac{1}{a} \left\{ \frac{K - (A_x - B)}{A_x - B} \right\}$	20112	-19 763	6.737E+1			170.8
Logit-log4P	$C_x = \sqrt[4]{\frac{1}{a} \left\{ \frac{K - (A_x - B)}{A_x - B} \right\}}$	19 247	-18 853	6.151E+1	1.028E+0		179.7
Logit-log5P	$a + b \cdot \ln C + c \cdot C - \ln \left\{ \frac{A_x - B}{K - (A_x - B)} \right\} = 0$	293	12 006	-3.644E+0	6.360E-1	1.430E-2	77.5
Spline	$f[C_x - C(I)] = a(I) + b(I) \cdot [C_x - C(I)]$	a(1)	a(I)	b(I)	c(I)	d(I)	143.9
	$+ C(I) \cdot [C_x - C(I)]^2 + d(I) \cdot [C_x - C(I)]^3 - A_x$	289	I=1~6	I=1~6	I=1~6	I=1~6	
Line-Graph	$C_x = \{K_N \cdot (A_x - A_N) + C_N\}$	K(1)	K(2)	K(3)	K(4)	K(5)	None
		717	946	1 293	1 424	3 137	

注:P 表示参数,C_x 为待测样品浓度,A_x 为待测样品测定吸光度值,s 值为拟合曲线校准品吸光度回归标准差。
3 讨论 根据表 1 计算结果可知,虽然五种校准方法检测结果均在卫生部室间质评允许误差范围内(约±30%),但不同校准方法检测结果之间有明显不同,统计学分析显示,五种校准方法测量偏倚差异有统计学意义($\chi^2=10.208, P<0.05$)。根据偏倚均值与标准差大小可知,Line-Graph 校准方法测量偏倚最小,为 9.6%,即测量结果与靶值最接近;Logit-log3P 校准方法测量偏倚最大,为 18.8%,即测量结果与靶值差异最大;而 Logit-log4P,Logit-log5P 与 Spline 三种校准方法测量偏倚较接近;但根据平均秩次(由小~大)进一步推断,五种校准方法测量偏倚由小到大的顺序依次为 Line-Graph, Logit-log5P, Spline, Logit-log4P, Logit-log3P。
Logit-log3P 与 Logit-log4P 校准方法适用于随着标准物质浓度升高而吸光度呈现为偏移收束的工作曲线,而 Logit-log5P 则适用于随着标准物质浓度升高而吸光度呈现为偏移收束较明显的工作曲线^[1,2]。对于前两者,仪器校准后分别自动生成 3 个参数(S1 ABS,K,a)和 4 个参数(S1 ABS,K,a,b),而后者则生成 5 个参数(S1 ABS,K,a,b,c),见表 2。由于这些非线性检量参数是用于校准曲线的计算的,理论上,参与计算的参数越多,计算结果越准确,因而 Logit-log4P 校准比 Logit-log3P

校准测量结果偏倚要小;而 Logit-log5P 具有同 Logit-log4P 同样的特征,但由于多一个计算参数,在某些情况下可使测量结果偏倚更小。表 1 结果显示,对数函数校准方法中,无论从测量偏倚或统计分析的平均秩次来看,Logit-log5P 校准曲线最好,其次为 Logit-log4P,而 Logit-log3P 校准曲线则较差。

Spline 校准法是为了使标准液(N)和标准液(N-1)之间的范围适应于前后的测定值使之接近,使总体为一条曲线的标准曲线,需要用到样条函数拟合的校准方法^[1,2];仪器自动生成 a(I),b(I),c(I)和 d(I) 4 个近似常数,其一般不能打印或显示,当 I=1 时,a(I)为 S1ABS,表示吸光度轴的截距。根据表 2 中的计算公式,样条函数是采用最小二乘法的三次曲线拟合而成,可以给出光滑的曲线,同时将测定误差也拟合到曲线中,理论上检测结果会比对数函数曲线检测结果更准确,但因最小二乘法中并不要求拟合后的曲线经过所有已知的点,只需要拟合多项式上的点在某种标准上与定点之间的差距最小即可,因此与原曲线的逼近程度较差。从表 1 可知,Spline 校准方法的平均偏倚虽然比对数函数校准方法小,但根据统计分析的平均秩次来看,有 5 个参数的 Logit-log5P 校准曲线比 Spline 校准曲线要更好。

Line-Graph 校准法是将标准液 1~6 的吸光度值用 5 条直线连接起来的工作曲线^[1,2];仪器自动生成 K1,K2,K3,K4,K5 各条直线的斜率与 S1 ABS,S2 ABS,S3 ABS,S4 ABS,S5 ABS,S6 ABS 各校准物质的吸光度。表 1 结果显示,Line-Graph 校准方法在本次研究中检测偏倚与平均秩次最小,是 mALB 测定试剂在本仪器的最佳校准曲线。这可能是因为它由 5 条直线组成的曲线,而各自有最适合的斜率 K 值,通过表 2 中计算公式可知,待测样本浓度 C_x 是在其前一校准计算点(C_N 与 A_N)的基础上通过与最适合的线段 K 值计算出来的。

s 值为校准拟合曲线计算出来的校准品吸光度与仪器实际测定的吸光度的回归标准差^[2],可用于衡量校准曲线各校准点的拟合程度。s 值越小,说明校准曲线拟合程度越好,反之越差。mALB 五种校准方法中,除 Line-Graph 外,仪器都能生成 s 值,从表 2 可以知道,Logit-log5P 曲线拟合程度最好,其次为 Spline 曲线,而 Logit-log3P 与 Logit-log4P 曲线拟合程度较差。理论上,拟合程度较好的曲线其检测结果也较好。因此,通过 s 值的大小也可验证了前述 Logit-log5P 校准曲线较其它三种曲线要好的结论。由于 Line-Graph 校准后仪器并没有生成 s 值,所以无法比较其 s 大小。

mALB 试剂盒说明书的校准说明只是要求用自带配套校准液进行 Logit-Log 非线性校准,并没有具体阐述用何种校准方法最适合。不同的曲线校准方式对测定结果有显著影响^[3],选择正确校准曲线不仅能提高检测结果的准确性^[4],还能减少因检测误差而导致的重复检查的浪费,更能避免患者病情误诊,对检验与临床均具有十分重要的意义。mALB 检测试剂在本仪器的五种非线性校准方法中确定最合适的校准方法为多元折线函数 Line-Graph,而不是试剂盒说明书上要求的 Logit-Log 函数,这与肖友益等^[5,6]通过不同的曲线拟合方法选择合适的校准方法,而不是选择试剂盒推荐的校准曲线的结论相一致。因此,通过对非线性检测项目进行多种校准方法验证十分必要。

参考文献:

- [1] 韩志钧,黄志锋,卢业成,等. 临床化学常用项目自动分析法[M]. 3 版. 辽宁:科学技术出版社,2005:29-37.
Han ZJ, Huang ZF, Lu YC, et al. Automatic analysis of tests in common use of clinical chemistry[M]. 3th Ed. Liaoning: Science and Technology Press, 2005: 29-37.
- [2] HITACHI. 7180 型全自动生化分析仪使用说明书[M]. 17 版. 日本东京:日本株式会社日立高新技术, 2008:50-74.
HITACHI. Operating instructions of automatic biochemistry analyzer of Hitachi 7180[M]. 17th Ed. Japan Tokyo: Hitachi High-Technologies Corporation, 2008:50-74.
- [3] 赵 斌,荆成宝,程晓军. 多点标准非线性校准在免疫透射比浊法 β_2 MG 测定中的应用[J]. 现代检验医学杂志, 2005, 20(4): 44-45.
Zhao B, Jing CB, Cheng XJ. Nonlinear calibration of multi point standards in the application in measurement of β_2 MG of the immune transmission turbidity method[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2005, 20(4): 44-45.
- [4] 骆春艳. 不同标准曲线拟合模式对化学发光免疫分析测定结果的影响[J]. 世界最新医学信息文摘(电子版), 2013, 13(5): 40, 46.
Luo CY. The influence of fitting patterns of different standard curves fitting model on chemiluminescence immuno assay-determination results[J]. World Latest Medicine Information, 2013, 13(5): 40, 46.
- [5] 肖友益. 化学发光免疫分析标准曲线拟合模式选择[J]. 现代检验医学杂志, 2009, 24(5): 157.
Xiao YY. The selection of fitting patterns of Standard curves in the chemiluminescence immunoassay [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2009, 24(5): 157.
- [6] 肖友益,冯兴梅,冯 英. 免疫球蛋白标准曲线拟合模式选择[J]. 现代检验医学杂志, 2004, 19(2): 35.
Xiao YY, Feng XM, Feng Y. The selection of fitting patterns of standard curves of immunoglobulin [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2004, 19(2): 35.

收稿日期:2015-06-17

修回日期:2015-08-18