

• 诊疗技术 •

# 肝素钠对白蛋白检测的干扰实验分析

田国亮<sup>1,2</sup>, 李有杰<sup>1</sup>

(1. 滨州医学院基础医学院, 山东 烟台 264003;

2. 淄博市第一医院检验科, 山东 淄博 255200)

**摘要:**目的 使用中华人民共和国卫生行业标准 WS/T 416-2013《干扰实验指南》文件评估肝素钠对溴甲酚绿法检测人血清白蛋白的干扰, 分析肝素钠不同浓度带来的结果差异。方法 收集淄博市第一医院 2020 年 12 月临床未使用肝素钠药物的患者的混合血清作为样本来源, 采用干扰物筛查实验对肝素钠的干扰作用进行确认, 并使用干扰物剂量效应评价实验探讨肝素钠浓度与其产生的干扰效应之间的相关性。结果 干扰物筛查实验证实浓度为 62.5 U/ml 的肝素钠对低、中、高浓度的血清白蛋白检测均产生干扰; 5 个浓度干扰物剂量效应评价实验证实肝素钠对人血清白蛋白检测产生线性负干扰。结论 肝素钠会对溴甲酚绿法检测人血清白蛋白产生负干扰, 实验室应尽量使用血清标本检测该项目; 对临床使用肝素钠进行抗凝治疗的患者标本, 应留意其白蛋白检测结果。

**关键词:** 干扰实验; 肝素钠; 人血清白蛋白; 生化检验

中图分类号: R331

文献标识码: A

DOI: 10.3969/j.issn.1006-1959.2022.08.044

文章编号: 1006-1959(2022)08-0168-04

## Analysis of the Interference Testing of Heparin Sodium on Albumin Detection

TIAN Guo-liang<sup>1,2</sup>, LI You-jie<sup>1</sup>

(1. School of Basic Medicine, Binzhou Medical University, Yantai 264003, Shandong, China;

2. Department of Clinical Laboratory, the First Hospital of Zibo City, Zibo 255200, Shandong, China)

**Abstract:** **Objective** To evaluate the interference testing of heparin sodium on the detection of human serum albumin by bromocresol green method using the guide of Interference Testing in Clinical Chemistry (Health Industry Standard of the People's Republic of China, WS/T416-2013), and to analyze the differences in results caused by different concentrations of heparin sodium. **Methods** The mixed serum of patients who did not use heparin sodium in the First Hospital of Zibo City in December 2020 was collected as a sample. The interference effect of heparin sodium was confirmed by interfering substance screening test, and the correlation between the concentration of heparin sodium and its interference effect was explored by interference dose effect evaluation experiment. **Results** Interfering substance screening test confirmed that heparin sodium at the concentration of 62.5 U/ml interfered with the detection of low, medium and high concentration of serum albumin. The dose-effect evaluation experiment of 5 concentration interferers confirmed that heparin sodium had linear negative interference on the detection of human serum albumin. **Conclusion** Heparin sodium will negatively interfere with the detection of human serum albumin by bromocresol green method. The laboratory should try to use serum samples to detect this item; for the patients who use heparin sodium for anticoagulation therapy, we should pay attention to the results of albumin test.

**Key words:** Interference testing; Heparin sodium; Human serum albumin; Clinical chemistry

目前检验科主要使用血清或者血浆本来定量检测白蛋白浓度, 如罗氏公司《白蛋白检测试剂盒说明书》中提到可以使用血清或者肝素锂、K<sub>2</sub>-EDTA 血浆检测白蛋白; 而贝克曼库尔特公司《白蛋白测定试剂盒(溴甲酚绿法)使用说明书》中提到仅可使用血清标本检测此项目。既往有报道显示<sup>[1-3]</sup>, 血浆标本与血清标本检测白蛋白的结果有差异。本研究根据中华人民共和国卫生行业标准 WS/T 416-2013《干扰实验指南》文件, 评价肝素钠对溴甲酚绿法检测人血清白蛋白的干扰效应, 现将结果报道如下。

### 1 材料和方法

#### 1.1 样本来源 收集淄博市第一医院 2020 年 12 月

作者简介: 田国亮(1984.12-), 男, 山东淄博人, 本科, 主管检验师, 主要从事临床生物化学和免疫学检验工作

通讯作者: 李有杰(1979.6-), 男, 山东潍坊人, 博士, 副教授, 主要从事肿瘤发生中的 miRNAs 的作用及机制和肿瘤检验诊断标志物的研究

临床未使用肝素钠药物的患者的混合血清作为样本来源, 根据《干扰实验指南》附录 B: 常见被测量的建议实验浓度和 ALB 的医学决定水平<sup>[4]</sup>, 共收集 3 个浓度, 分别为 25、35 和 50 g/L。

1.2 仪器和试剂 全自动生化分析仪(美国贝克曼库尔特有限公司, 型号: AU5800); 白蛋白测定试剂盒(美国贝克曼库尔特有限公司, 批号 AUZ8181)与配套校准物(批号 1121M)。检测前仪器功能正常, 质控在控。

1.3 干扰物储存液配制 取用肝素钠注射液(江苏万邦生化医药股份有限公司, 规格: 2 ml:12 500 U), 加去离子水 8 ml 至溶液总容积为 10 ml, 使肝素钠浓度稀释为 1250 U/ml<sup>[5]</sup>。

#### 1.4 干扰物筛查实验(配对差异实验)

1.4.1 样本制备 ①基础样本: 取 ALB 浓度分别为 25、35 和 50 g/L 的血清作为基础样本液; ②测试样本: 实验样本与对照样本制备方法见表 1。实验样本中基础样本与干扰物储存液的比例为 19:1, 其中肝

素钠浓度为 62.5 U/ml;对照样本中基础样本与生理盐水的比例为 19:1,其中肝素钠浓度为 0 U/ml。

1.4.2 确定干扰判断标准 本实验基于 ALB 总误差 6%<sup>[6]</sup>的 1/3,即 2% 偏倚作为最大允许干扰值  $d_{\max}$ 。

1.4.3 测定重复次数 依据《干扰实验指南》,计算出最大允许干扰值  $d_{\max}$  与批内重复性标准差  $s$  的比值,其中  $s$  由基础样本重复检测 20 次计算而得<sup>[7]</sup>。通过查表得出 ALB 不同浓度水平的重复测定次数。

1.4.4 检测要求 为避免携带污染,将实验样本 T 和对照样本 C 按交互顺序检测,中间插入额外检测的对照样本 CX,标本按如下顺序检测: C<sub>1</sub>T<sub>1</sub>C<sub>X</sub>C<sub>X</sub>C<sub>2</sub>T<sub>2</sub>C<sub>X</sub>C<sub>X</sub>……C<sub>n</sub>T<sub>n</sub>。

1.4.5 数据处理与分析 ①干扰效果  $d_{\text{obs}}$  的计算:干扰效果  $d_{\text{obs}}$ =实验样本测定均值( $x_{\text{test}}$ )-对照样本测定均值( $x_{\text{control}}$ )<sup>[8]</sup>;②计算临界值  $d_c=(d_{\text{null}}+SZ_{1-\alpha/2})/\sqrt{n}$ ,

式中  $d_{\text{null}}$  为无效假设的值,通常为 0; $s$  为批内标准差, $Z_{1-\alpha/2}$  为相对于双边检验 100(1- $\alpha$ )%可信区间时正态分布的百分位点, $n$  为重复测定次数。

1.5 干扰物剂量效应评价实验

1.5.1 样本制备 ①基础样本:取 ALB 浓度分别为 25、35 和 50 g/L 的血清作为基础样本液;②含不同剂量干扰物的测试样本:干扰物高实验浓度样本制备方法参见 1.4.1 中实验样本的制备,其肝素钠浓度为 62.5 U/ml。干扰物低实验浓度样本的制备参见 1.4.1 中对照样本的制备,其肝素钠浓度为 0 U/ml;③将肝素钠浓度为 62.5 U/ml 的测试样本与肝素钠浓度为 0 U/ml 的测试样本,按照 0:4、1:3、1:1、3:1、4:0 的比例进行配制,可得到肝素钠浓度依次递升的 5 个浓度水平实验样本,具体制备方法见表 2。

表 1 实验样本与对照样本的制备(μl)

样本制备种类与体积	样本制备方法		
	基础样本用量	干扰物储存液用量	生理盐水用量
实验样本 1 ml	950	50	0
对照样本 1 ml	950	0	50

表 2 肝素钠不同浓度水平样本的制备

用量比例	高实验浓度样本用量(μl)	低实验浓度样本用量(μl)	样本中肝素钠浓度(U/ml)
0:4	0	400	0
1:3	100	300	15.625
1:1	200	200	31.25
3:1	300	100	46.875
4:0	400	0	62.5

1.5.2 测试重复次数 共测定 5 次,排除方法精密度对结果的影响。

1.5.3 剂量效应分析 计算样本中肝素钠浓度为 0 U/ml 的实验样本的测定均值,用肝素钠浓度依次递升的 5 个浓度水平实验样本的每个测定值减去此均值,得出不同肝素钠浓度水平下的干扰效果。以干扰效果为 Y 值,肝素钠浓度为 X 值,利用 SPSS 24.0 软件描绘散点图。如果散点图上数据成近似直线走向,则用线性回归进行分析,计算回归方程;如果散点图上数据显示非线性,则使用非线性回归来评估干扰物的剂量效应。

2 结果与分析

2.1 干扰物筛查实验(配对差异实验)

2.1.1 重复次数的确定 3 个浓度基础样本 20 次测定的 ALB 均值分别为 24.69、34.49、49.59 g/L,  $d_{\max}$  分别为 0.49、0.69、0.99 g/L,  $s$  分别为 0.14、0.23、0.33;3 个

浓度 ALB 的  $d_{\max}/s$  均  $\geq 3$ ,确定测定次数均为 3 次。

2.1.2 干扰效应分析 3 个浓度 ALB 的  $d_{\text{obs}}$  分别为 -1.1、-1.03、-0.77,  $d_c$  分别为 0.16、0.26、0.37,  $|d_{\text{obs}}| > d_c$ ,表明 3 个浓度下,62.5 U/ml 的肝素钠对 ALB 测定均存在干扰。

2.2 剂量效应实验 将干扰效果 (Y)、干扰物浓度 (X) 等数据输入 SPSS 24.0 软件中,绘制出干扰物剂量相关曲线。由曲线可知,肝素钠对 3 个浓度下 ALB 测定产生线性负干扰,见图 1~图 3;低、中、高 3 个浓度 ALB 的线性回归方程结果显示,肝素钠在 3 个 ALB 浓度下均与干扰效果存在线性回归关系 ( $t=7.100、12.280、4.130, P<0.001$ );代入线性公式计算得,在肝素钠浓度  $<3.19$  U/ml 时不会对低浓度 ALB 测定产生干扰;在肝素钠浓度  $<17.42$  U/ml 时不会对中浓度 ALB 测定产生干扰;在肝素钠浓度  $<30.86$  U/ml 时不会对高浓度 ALB 测定产生干扰。

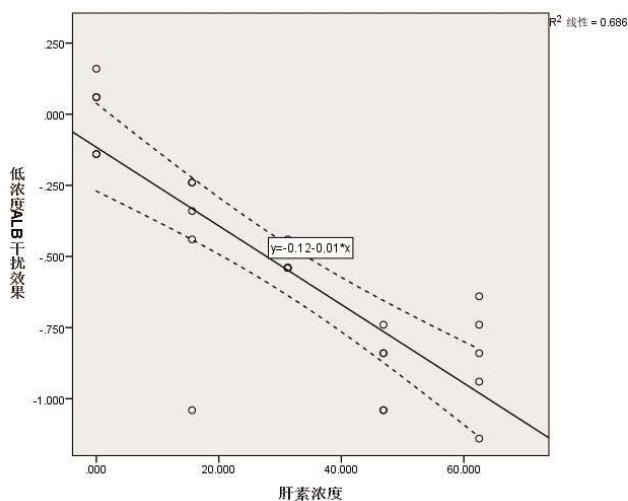


图 1 肝素钠对低浓度 ALB 干扰的剂量效应曲线

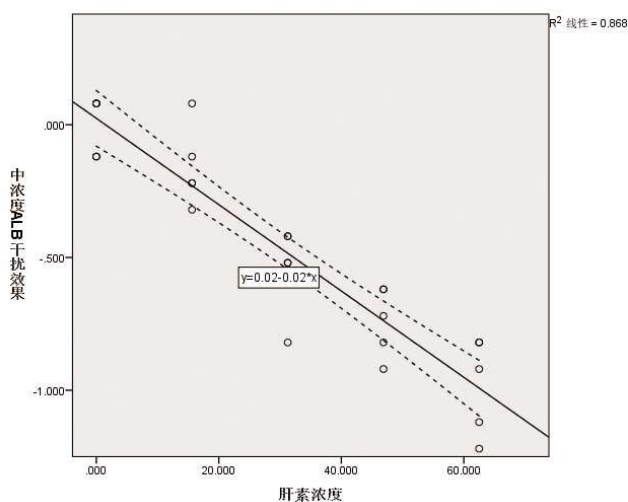


图 2 肝素钠对中浓度 ALB 干扰的剂量效应曲线

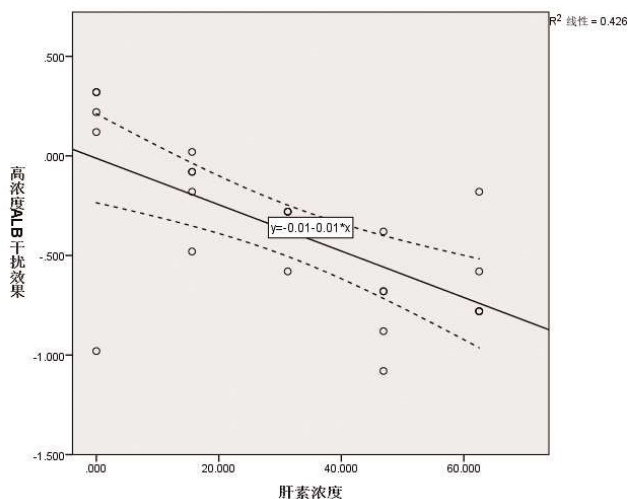


图 3 肝素钠对高浓度 ALB 干扰的剂量效应曲线

### 3 讨论

ALB 是人体血浆中含量最为丰富的蛋白质,占总蛋白的 57%~68%。其为人体重要的营养蛋白,并参与维持酸碱平衡、维持血浆胶体渗透压,能保持人体内环境的稳定,还能转运血浆中多种物质<sup>[9]</sup>。在肾

病患者中,白蛋白检测可以评估患者的预后情况,而且是透析患者护理质量的一项评价指标。白蛋白还可作为健康老年人预测死亡率的因素<sup>[10]</sup>。人血清白蛋白浓度也被用来通过佩恩公式估计校正后的钙水平,从而减少对钙浓度的错误估计<sup>[11]</sup>。目前,人体内

白蛋白的检测方法主要有蛋白电泳法、染料结合法(包括溴甲酚绿法和溴甲酚紫法)和免疫比浊法<sup>[12]</sup>;其中溴甲酚绿法为大多数全自动生化分析仪配套的检测方法,其检测成本低廉,精密度高,线性范围宽,适用于大部分的患者<sup>[13]</sup>。但由于一些已知或不明原因,溴甲酚绿法 ALB 检测会存在其他非白蛋白类物质的非特异干扰,影响检测结果的准确性<sup>[14-16]</sup>。该项目的测量误差可造成临床医生对患者身体状况的评估失误,甚至影响对患者的治疗。

肝素是一种带有强大负电荷的粘多糖硫酸酯,因首先从肝脏中发现而得名,其平均分子量为 15 KDa,呈强酸性。肝素也存在于肺、血管壁、肠粘膜等组织中,是动物体内一种天然抗凝血物质。肝素天然存在于肥大细胞,现在主要从牛肺或猪小肠黏膜提取。其作为一种抗凝剂已有 90 多年的历史<sup>[17]</sup>,是由两种多糖交替连接而成的多聚体,在体内外都有抗凝血作用,是世界上使用最广泛的临床抗凝剂。肝素通过与抗凝血酶Ⅲ相互作用来抑制血栓形成。临床上主要用于血栓栓塞性疾病、心肌梗死、心血管手术、心脏导管检查、体外循环、血液透析等。随着药理学及临床医学的进展,肝素的应用不断扩大。在临床中主要用其肝素钠或者肝素钙的水溶液。

检测方法的总误差包括不精密度、方法特异性偏倚和样本特异性偏倚<sup>[18]</sup>。干扰物既能引起系统误差,也会造成随机误差。对于某些方法,干扰效果的影响超过了不精密度,就成为随机误差的主要来源。从患者个体来说,干扰物引起的检测误差随着患者样本中干扰物浓度的改变而改变。

通过参考《干扰实验指南》,用将潜在干扰物添加到样本中的方式来评价干扰效应,筛选、证实、量化潜在的干扰物质,明确检测方法对干扰物质的敏感性,及时作出风险评估,必要时发布特殊的声明或警示以提醒临床。

由干扰物筛查实验(配对差异实验)、剂量效应实验结果可知,62.5 U/ml 肝素钠会对 ALB 低、中、高 3 个浓度测定产生负干扰。其原因可能为肝素是一种带有强大负电荷的粘多糖硫酸酯,在到达一定浓度时可能与 ALB 测定试剂中带阴离子的溴甲酚绿染料竞争带正电荷的 ALB 分子(pH 4.2)的结合位点,使 ALB 与染料结合减少,导致 ALB 测定结果偏低<sup>[19]</sup>。

综上所述,肝素钠作为干扰物质,对 ALB 测定的影响随着 ALB 浓度的增加而减弱。目前临床常规生化分析多采用血清标本进行检测。但是对于临床使用肝素钠药物的患者,尤其对于留置管采血时混入肝素的透析患者,要注意其 ALB 结果的准确性,特别是在 ALB 浓度偏低时,必要时检验人员应予以说明。

## 参考文献:

- [1]姚维菊.不同血液样本在常规生化项目检测中的结果比较[J].检验医学与临床,2013,10(4):468-469.
- [2]黄华翠.肝素锂抗凝血浆与血清生化检测指标结果比对研究[J].医学理论与实践,2013,26(19):2625-2626.
- [3]谭雁波.不同血液标本在生化项目检测中的结果对比[J].临床检验杂志(电子版),2018,7(2):327-328.
- [4]冯文强,易向民,关卓辉,等.免疫透射比浊法血清白蛋白检测试剂盒的性能验证和临床应用评价[J].标记免疫分析与临床,2020,27(3):528-532.
- [5]WS/T 416-2013,干扰实验指南[S].北京:中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会,2013.
- [6]WS/T 403-2012,临床生物化学检验常规项目分析质量指标[S].北京:中华人民共和国卫生部,2013.
- [7]沈建江,符步清,赵春,等.运用 CLSI EP7-A2 文件评价溶血对血糖检测的影响[J].检验医学,2018,33(5):404-406.
- [8]肖华勇,聂滨.肝素对肌酸激酶及其同工酶测定干扰评价[J].国际检验医学杂志,2015,36(9):1264-1266.
- [9]尚红.全国临床检验操作规程[M].北京:人民卫生出版社,2015:203.
- [10]Kumar D,Banerjee D.Methods of albumin estimation in clinical biochemistry:Past, present, and future[J].Clinica Chimica Acta,2017(469):150-160.
- [11]Carroll B,Fleisher M,Pessin MS,et al.Pseudohypocalcemia in Cancer Patients:A Recommendation for the Postanalytical Correction of Serum Calcium in Patients with Hypoalbuminemia[J].Clinical Chemistry,2017,63(7):1302-1304.
- [12]Le Reun E,Leven C,Lapègue M,et al.Assessment of immunoturbidimetric DiAgam kit for plasma albumin measurement:a comparative study [J].Annales de biologie Clinique,2018,76(4):477-479.
- [13]刘非,邱先桃,杨丽媛,等.溴甲酚绿法检测低浓度血清清蛋白的偏差分析和临床诊断应用的局限性[J].现代检验医学杂志,2019,34(3):30-33.
- [14]Padelli M,Leven C,Le Reun E,et al.Is capillary zone electrophoresis a suitable method for estimating serum albumin:A comparison of four methods[J].Clinica Chimica Acta,2018(487):250-255.
- [15]Delanghe S,Biesen WV,Velde NV,et al.Binding of bromocresol green and bromocresol purple to albumin in hemodialysis patients [J].Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM),2018,56(3):436-440.
- [16]黄小华,方照舟,黄益楚,等.溴甲酚绿与溴甲酚紫法测定白蛋白的差异比较[J].检验医学,2013,28(1):88-89.
- [17]Onishi A,St Ange K,Dordick JS,et al.Heparin and anticoagulation [J].Frontiers in bioscience (Landmark edition),2016,21(7):1372-1392.
- [18]EP7-A2,Interference testing in clinical chemistry [S].CLSI,2002.
- [19]王兴宁,李静,雷光星.肝素钠浓度对清蛋白测定结果的影响[J].检验医学与临床,2008,5(22):1387.

收稿日期:2021-04-08;修回日期:2021-07-27

编辑/肖婷婷