

# 溴甲酚绿法与免疫比浊法联合应用 避免尿微量白蛋白检测假阴性结果

陈素芸 冯艳 李朝贵

作者单位: 400061 重庆, 武警重庆总队医院检验科

通信作者: 李朝贵, Email: 125002441@qq.com

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2024.02.023

**【摘要】** 目的 预防尿微量白蛋白(mALB)检测因发生钩状效应导致结果与临床实际情况不符,对发生钩状效应的标本使用溴甲酚绿法联合检测,并验证其可行性。**方法** 收集 2023 年 1 月—2023 年 5 月武警重庆总队医院检验科的 20 份新鲜高白蛋白尿液标本,根据免疫比浊法按原倍或稀释模式确定理论浓度;考虑到溴甲酚绿法的检测低限和检测线性范围上限,将溴甲酚绿法样本增量 5 倍定位浓度梯度。将免疫比浊法标准样本量测定白蛋白的结果与理论浓度绘制曲线,评估钩状效应。同时采用溴甲酚绿法取样本增量 5 倍检测,每份样本检测 3 次,计算均值、变异系数(CV)以及与已知理论浓度的偏移(Bias)。评估发生钩状效应的标本使用溴甲酚绿法检测的可行性。**结果** 当尿 mALB 浓度大于 1 082 mg/L 时,免疫比浊法出现钩状效应,直接测定结果与临床不相符。而溴甲酚绿法在尿 mALB 浓度达到 412 mg/L 时,样本增量 5 倍测定结果可满足临床要求。**结论** 在尿 mALB 浓度达到 412 mg/L 时,可用溴甲酚绿法样本增量 5 倍测定替代免疫比浊法,两种方法联合应用可避免尿 mALB 检测结果因发生钩状效应导致与临床实际情况不相符。

**【关键词】** 尿微量白蛋白; 钩状效应; 免疫比浊法; 溴甲酚绿法

## Combined application of bromocresol green method and immunoturbidimetry to avoid false negative results in urinary microalbumin detection

Chen Suyun, Feng Yan, Li Chaogui. Department of Clinical Laboratory, Chongqing Armed Police Force Hospital, Chongqing 400061, China

Corresponding author: Li Chaogui, Email: 125002441@qq.com

**【Abstract】 Objective** To prevent the occurrence of discrepancies between urinary microalbumin (mALB) detection results and clinical actual situation due to hook-like effect, using bromocresol green method in combination with detection for specimens with hook-like effect, and to verify its feasibility. **Methods** Twenty fresh high-albumin urine samples were collected from the clinical laboratory department of Chongqing Armed Police Force Hospital from January 2023 to May 2023, and the theoretical concentration was determined according to the immunoturbidimetric method in original fold or dilution mode. Considering the low limit of detection and the upper limit of detection linear range of bromocresol green method, the concentration gradient of bromocresol green method was determined through increasing the sample by 5 times. The results of albumin determination with standard sample capacity of immunoturbidimetry and theoretical concentration were plotted to evaluate the hook-like effect. At the same time, bromocresol green method was used to detect the sample size increasing by 5 times, each sample was tested for 3 times, and the average value, coefficient of variation (CV) and deviation from the known theoretical concentration (Bias) were calculated. The feasibility of using bromocresol green method to detect samples with hook-like effect was evaluated. **Results** When the urinary mALB concentration was greater than 1 082 mg/L, the hook-like effect appeared by immunoturbidimetry, and the direct results were not consistent with the clinical results. When the concentration of urinary mALB reached 412 mg/L, the results of sample increment for 5 times could meet the clinical requirements. **Conclusions** When the concentration of urinary mALB reaches 412 mg/L, the bromocresol green method with 5 times increase of the sample could be used to replace the immunoturbidimetric method. The combined detection of the two methods could avoid the incompatibility of the detection results of urinary mALB due to hook-like effect.

**【Key words】** Urinary microalbumin; Hook-like effect; Immunoturbidimetry; Bromocresol green method

尿微量白蛋白(microalbumin, mALB)水平升高是糖尿病患者进展至终末期肾病的独立危险因素<sup>[1]</sup>,该指标也是血管通透性增加的生物标志物,与心血管疾病的发病率和病死率增加有关<sup>[2-4]</sup>。尿 mALB 检测可广泛应用于各种原因导致的肾小球早期病变的诊断。尿白蛋白/肌酐比值(albumin to creatinine ratio, ACR)已成为慢性肾脏疾病筛查和分期的重要指标之一<sup>[5-6]</sup>。

目前临床多采用免疫透射比浊法测定尿 mALB,该方法简便快速,适用于自动化设备分析。近年来我们发现部分患者尿 mALB 检测结果与尿常规中蛋白定性检测结果不相符,肾病综合征患者检测 mALB 结果假性偏低,稀释后再次检测证实是由于尿液中的高浓度白蛋白(albumin, ALB)导致反应过程中出现钩状效应,使检测结果为假阴性或假性降低<sup>[7-8]</sup>。mALB 检测发生钩状效应会导致高浓度样本被误报为低浓度或正常浓度,可能误导临床制定治疗方案<sup>[9]</sup>,为防止这种情况,本研究旨在评估两种不同方法联合检测尿 mALB 的结果差异,避免尿 mALB 结果与临床实际不符,现将结果报告如下。

## 1 材料和方法

**1.1 样本收集** 收集 2023 年 1 月—2023 年 5 月本院检验科接收的 20 份新鲜高白蛋白尿液标本,浑浊尿液采用 1 500 r/min 离心 10 min 取上清液,排除检测中的非病理性因素干扰,已知 ALB 浓度通过免疫比浊法按原倍或稀释模式,即根据固定时间-吸光度预警参数提示钩状效应对标本进行稀释测定,稀释倍数测定考虑免疫比浊法的检测线性,稀释测定结果带入误差小,预设稀释倍数为 10 倍,如提示钩状效应则稀释 20 倍复测,测定结果接近溴甲酚绿法样本增量 5 倍检测线性范围。

**1.2 仪器和试剂** 检测仪器为迈瑞 BS-2200M 全自动生化分析仪。尿 mALB 试剂盒(免疫比浊法)及配套校准品采用北京利得曼生物有限公司试剂,检测线性范围为 0~1 000 mg/L。ALB 试剂盒(溴甲酚绿法)及配套校准品采用重庆中元汇吉生物有限公司试剂,样本与试剂比例为 1:100,检测线性范围为 5~60 g/L,检测低限为 0.44 g/L<sup>[10]</sup>;样本增量 5 倍则样本与试剂比例为 1:20,可提高检测敏感度,线性范围为 1~12 g/L。

本实验室 2022 年度尿 mALB 质控品中高水平室内变异系数(coefficient of variation, CV)分别为 5.11 和 3.23, ALB 室内质控品中高水平 CV 分别为 1.38

和 1.33;2023 年度国家卫生健康委临床检验中心室间质评成绩合格。

## 1.3 研究方法

**1.3.1 免疫比浊法钩状效应评估** 将收集的 20 例尿液标本已知浓度设为理论浓度  $x$ ,采用免疫比浊法标准样本量测定 mALB,标准样本量测定浓度结果为  $y$ ,绘制两组数据散点图,评估钩状效应。当标准样本量测定浓度结果与理论浓度达到负偏移 15% (1/2 国家卫生健康委室间质量评价标准)时,标准样本量测定结果则与临床数据不匹配。

**1.3.2 溴甲酚绿法检测结果对比** 将收集的 20 例尿液样本同时采用溴甲酚绿法样本增量 5 倍测定 mALB 浓度,每份样本测试 3 次,计算均值、CV 以及与理论浓度的偏移(theoretical concentration deviation, Bias),  $CV \leq 10\%$  (1/3 国家卫生健康委室间质量评价标准),  $Bias \leq \pm 15\%$  (1/2 国家卫生健康委室间质量评价标准);以理论浓度为  $X$ ,溴甲酚绿法样本增量 5 倍测定 ALB 浓度结果为  $Y$ ,采用线性拟合方式,计算评估溴甲酚绿检测结果与理论值的回归方程  $Y = a + bx$  和相关系数(correlation coefficient,  $R^2$ )。  $R^2 > 0.95$ ,  $b$  值为 0.97~1.03 则评估合格。

**1.4 统计学处理** 应用 Microsoft Excel 2013 软件分别对两组数据绘制散点图和线性拟合曲线。

## 2 结果

**2.1 钩状效应评估** 当尿 mALB 的理论浓度达到 1 082 mg/L 时,标准样本量测定结果为 915 mg/L,与理论结果偏移达到 -15.4%,大于 15% (1/2 国家卫生健康委室间质量评价标准),表明免疫比浊法标准样本量测定结果不可靠。当理论浓度为 3 119 mg/L 时,反应曲线出现拐点,当理论浓度达到 6 192 mg/L 时,实测值为 897 mg/L,小于厂家线性上限。散点图见图 1,评估结果见表 1。

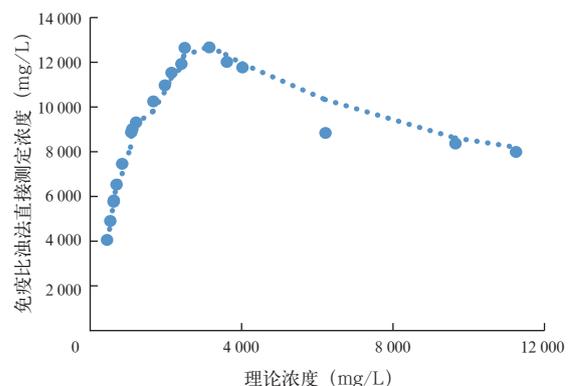


图 1 免疫比浊法直接测定与理论浓度散点图

表 1 溴甲酚绿法与免疫比浊法检测结果比较

理论值 (mg/L)	蛋白定性	理论值稀释倍数	溴甲酚绿样本增量 5 倍均值 (mg/L)	CV (%)	与理论值 Bias (%)	免疫比浊法原倍检测值 (mg/L)	与理论值 Bias (%)
412	+	原倍	398	0.4	-3.3	412	
498	+	原倍	467	0.8	0.8	498	
585	++	原倍	547	0.7	-6.0	585	
591	++	原倍	625	0.4	5.8	591	
663	++	原倍	709	0.7	6.9	663	
812	++	10 倍	849	0.7	4.5	757	-6.8
1 052	+++	10 倍	1 110	0.6	5.5	900	-14.4
1 082	+++	10 倍	1 067	0.3	-1.4	915	-15.4
1 181	+++	10 倍	1 290	0.7	9.2	945	-20.1
1 638	+++	10 倍	1 536	0.7	-6.2	1 040	-36.5
1 942	+++	10 倍	1 896	0.7	-2.4	1 113	-42.7
2 118	+++	10 倍	2 078	0.3	-1.9	1 170	-44.8
2 380	+++	10 倍	2 351	0.3	-1.2	1 210	-49.2
2 468	+++	10 倍	2 808	0.8	13.8	1 283	-48.0
3 119	+++	10 倍	3 045	0.7	-2.4	1 285	-58.8
3 583	+++	10 倍	3 961	0.9	10.5	1 219	-66.0
3 996	+++	10 倍	3 850	0.3	-3.6	1 194	-70.1
6 192	+++	10 倍	6 237	0.7	0.7	897	-85.5
9 632	+++	20 倍	9 506	0.2	-1.3	849	-91.2
11 234	+++	20 倍	10 782	0.4	-4.0	811	-92.8

注: CV 为变异系数, Bias 为与理论值的偏移; 空白代表未稀释测定无数值

**2.2 理论浓度与溴甲酚绿法检测结果比较** 3 次计算 CV 均小于 10%, 偏移 Bias < ± 15%, 与理论值相关性良好 ( $R^2=0.9974$ ), 回归方程为  $y=0.973x+71.214$ , b 值为 0.97 ~ 1.03。可见在尿 mALB 浓度为 412 mg/L 时, 采用溴甲酚绿法增量 5 倍测定尿 mALB 所得结果与理论浓度相关性良好, 当样本尿 mALB 浓度达到 412 mg/L 时, 溴甲酚绿法增量 5 倍检测结果可满足临床需要。两种方法学联合应用能避免免疫比浊法因发生钩状效应导致与临床实际情况不相符。溴甲酚绿法样本增量 5 倍测定结果见表 1, 线性拟合曲线见图 2。

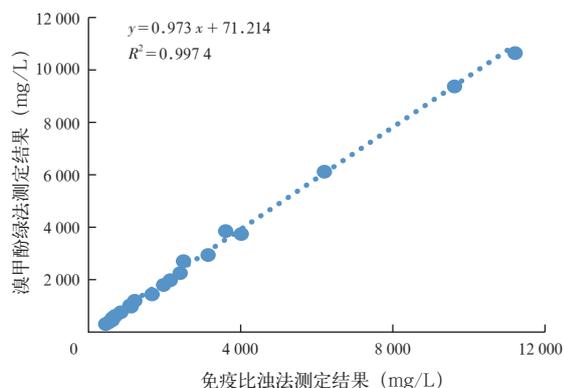


图 2 溴甲酚绿法与免疫比浊法所得结果的线性拟合曲线

### 3 讨论

免疫比浊法是基于抗原-抗体反应的检测方法, 该方法的特点是敏感度高, 线性范围窄, 当抗原与抗体比例不合适时会产生钩状效应。尿 mALB 的浓度分布范围差异较大, 可能超过参考区间上限的 1 837 倍, 且超过的倍数越多, 发生钩状效应的概率越高<sup>[11-13]</sup>。当出现钩状效应而检测者未发现时, 则会发出错误报告。溴甲酚绿法的检测线性范围较宽, 但敏感度较低, 无法满足尿 mALB 的检测需要。

为保证尿 mALB 临床检验结果的准确性, 仪器

和试剂厂家采取各种措施来避免发生钩状效应<sup>[14]</sup>:

① 迈瑞生化仪可设置前带检测提示钩状效应的发生, 但由于该仪器为开放系统, 参数建立过程复杂, 仪器的计算公式不完全透明, 试剂的批次差异性影响难以评估; ② 抗原再添加增加了试剂成本, 测试流程复杂, 降低仪器的测试效率等因素影响参数设置<sup>[15-17]</sup>; ③ 有部分厂家采用样本预稀释的方法来解决上述问题<sup>[14]</sup>, 通过对样本进行预稀释, 降低反应体系中的抗原浓度, 可以有效扩大检测范围, 但是该方案同时会影响检测结果的敏感度<sup>[18-19]</sup>; ④ 优化试剂配方, 通过试剂配方优化直接使可见浓度范围内不会发生抗原过剩, 但该方法会导致试剂成本的增加, 对样本浓度分布不是特别宽的项目较实用<sup>[11]</sup>。部分开放系统甚至无任何钩状效应的预防措施。

鉴于以上因素, 联合应用免疫比浊法和溴甲酚绿法判断是否发生钩状效应, 为问题提供了新的解决方法和思路。本研究在实验室信息系统 (laboratory information system, LIS) 中将尿 mALB 定性设置为关联项目, 同时结合尿总蛋白, 血清 mALB 以及临床诊断, 当尿 mALB 定性为“-”“+-”到“+”, 则可以直接采用免疫比浊法标准样本量模式测定; 当尿 mALB 定性为大于“++”时, mALB 定量采用免疫比浊法标准样本量模式测定, 同时联合溴甲酚绿法样

本增量 5 倍模式测定,在两者均 < 1 082 mg/L 且结果相符时,直接报告免疫比浊法结果;当溴甲酚绿法所得测定值  $\geq 1 082$  mg/L,而免疫比浊法测定值 < 1 082 mg/L 时,则表明在免疫比浊法检测过程中发生了钩状效应,可直接参考溴甲酚绿法测定结果报告。如果关联项目均无,则两种方法学联合应用,可避免因发生钩状效应而导致与临床实际情况不相符。如果溴甲酚绿法所得检测结果 > 11 234 mg/L,则直接启用溴甲酚绿法标准量测定。

综上所述,溴甲酚绿法与免疫比浊法联合应用,试剂成本看似增加约 5%,但减少了免疫比浊法因发生钩状效应稀释和复测的成本;同时可节约样本稀释复测时间,缩短周转时间(turnaround time, TAT);避免尿液 mALB 检测出现钩状效应导致与临床实际情况不相符。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- McGILL J B, HALLER H, ROY-CHAUDHURY P, et al. Making an impact on kidney disease in people with type 2 diabetes: the importance of screening for albuminuria [J]. *BMJ Open Diabetes Res Care*, 2022, 10 (4): DOI: 10.1136/bmjdr-2022-002806.
- PAFUNDI P C, GAROFALO C, GALIERO R, et al. Role of albuminuria in detecting cardio-renal risk and outcome in diabetic subjects [J]. *Diagnostics (Basel)*, 2021, 11 (2): 290. DOI: 10.3390/diagnostics11020290.
- 元婷. 糖化血红蛋白与尿微量白蛋白联合检测在老年早期糖尿病肾病诊断中的应用 [J]. *实用检验医师杂志*, 2024, 16 (1): 32-35. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2024.01.008.
- 陈廷洪. 糖脂代谢指标及尿微量白蛋白检测在糖尿病肾病早期诊断中的应用 [J]. *实用检验医师杂志*, 2022, 14 (3): 245-248. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2022.03.006.
- 上海市肾内科临床质量控制中心专家组. 慢性肾脏病早期筛查、诊断及防治指南(2022 年版)[J]. *中华肾脏病杂志*, 2022, 38 (5): 453-464. DOI: 10.3760/cma.j.cn441217-20210819-00067.
- 王璐, 李汉华, 张敏, 等. 慢性肾脏病生化检测项目的风险评估 [J]. *检验医学*, 2017, 32 (11): 958-961. DOI: 10.3969/j.issn.1673-8640.2017.011.004.

- BACHMANN L M, NILSSON G, BRUNS D E, et al. State of the art for measurement of urine albumin: comparison of routine measurement procedures to isotope dilution tandem mass spectrometry [J]. *Clin Chem*, 2014, 60 (3): 471-480. DOI: 10.1373/clinchem.2013.210302.
- JACOBSON B E, SECCOMBE D W, KATAYEV A, et al. A study examining the bias of albumin and albumin/creatinine ratio measurements in urine [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2015, 53 (11): 1737-1743. DOI: 10.1515/cclm-2014-1105.
- MERRILL A E, KHAN J, DICKERSON J A, et al. Method-to-method variability in urine albumin measurements [J]. *Clin Chim Acta*, 2016, 460: 114-119. DOI: 10.1016/j.cca.2016.06.015.
- 尹一兵, 倪培华. 临床生物化学检验技术 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2015: 82-85.
- 亓曲, 罗桑次珍, 泽仁曲措, 等. 联合检测尿总蛋白避免尿微量白蛋白钩状效应的方法 [J]. *检验医学*, 2021, 36 (5): 477-479. DOI: 10.3969/j.issn.1673-8640.2021.05.003.
- 丛玉隆. 生物化学检验技术与应用 [M]. 北京: 科学出版社, 2021: 28-36.
- 张红燕, 尚跃丰, 李家瑞, 等. 尿肾损伤分子-1 对脓毒症大鼠急性肾损伤的诊断价值 [J]. *中华危重病急救医学*, 2015, 27 (5): 389-391. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.05.016.
- 张琪, 夏良裕, 王健. 尿微量白蛋白检测试剂的性能验证 [J]. *标记免疫分析与临床*, 2021, 28 (1): 132-136. DOI: 10.11748/bjmy.issn.1006-1703.2021.01.028.
- 杨杰, 李茂城, 尹小毛, 等. 27 项特定蛋白项目检测结果分析及钩状效应的防范方法 [J]. *检验医学与临床*, 2019, 16 (1): 8-12. DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2019.01.003.
- 夏勇, 薛灏, 李明洋, 等. 免疫透射比浊法自建检测系统钩状效应性能确认方法的建立 [J]. *检验医学*, 2018, 33 (12): 1132-1135. DOI: 10.3969/j.issn.1673-8640.2018.12.017.
- 徐盈, 韩斌, 陈国兵, 等. 血必净注射液干预治疗糖尿病肾病的临床观察 [J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2014, 21 (1): 35-38. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2014.01.009.
- DATTA P, DASGUPTA A. An improved microalbumin method (microALB<sub>2</sub>) with extended analytical measurement range evaluated on the ADVIA chemistry systems [J]. *J Clin Lab Anal*, 2009, 23 (5): 314-318. DOI: 10.1002/jcla.20341.
- 冯洋. 尿微量白蛋白检测试剂盒性能验证 [J]. *实用检验医师杂志*, 2018, 10 (1): 18-20. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2018.01.006.

(收稿日期: 2024-04-22)

(本文编辑: 邵文)

## 关于杜绝和抵制第三方机构代写代投稿件的通知

近期刊编辑部监测到部分用户使用虚假的手机号和 Email 地址注册账号,这些账号的投稿 IP 地址与作者所在单位所属行政区域严重偏离,涉嫌第三方机构代写代投。此类行为属于严重的学术不端,我们已将排查到的稿件信息通报编辑部各位编审人员,编辑部处理收稿的编务部门也将对此类账号做封禁处理,相关稿件一律做退稿处理。

为弘扬科学精神,加强科学道德和学风建设,抵制学术不端行为,端正学风,维护风清气正的良好学术生态环境,请广大读者和作者务必提高认识,规范行为,以免给作者的学术诚信、职业发展和所在单位的声誉带来不良影响。

《实用检验医师杂志》编辑部