

血清钙离子检测系统量值溯源性研究

刘 丽¹, 陈 卫², 谭 韬² (1. 湖北省十堰市茅箭区人民医院检验科 442012; 2. 四川省新成生物科技有限公司, 成都 611731)

【摘要】 目的 建立无机钙离子检测系统的溯源性, 提高最终检测结果的准确性。**方法** 依据《GB/T 21415-2008/ISO 17511:2003》国际标准溯源链式图自建十堰市茅箭区人民医院溯源流程图; 购买参考物质 NIST SRM 909b, 首先将厂商提供的工作校准品溯源至参考物质, 然后将产品校准品溯源至厂商工作校准品, 并计算合成不确定度, 完成医院无机钙离子产品校准品的量值溯源。**结果** 通过临床新鲜血清标本测定和临床比对, 确保了参考物质具有互通性, 同时采用 SPSS17.0 进行统计学分析, 以 97% 的预测区间和检测项目 1/4CLIA'88 总允许误差为标准, 达到量值传递验证要求, 进一步确定了不确定度, 完成了量值溯源工作。**结论** 该院自建溯源流程成功对产品校准品进行了赋值修正, 提高了试剂检测结果的准确性。

【关键词】 钙; 参考值; 回归分析

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2011.18.019 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2011)18-2217-02

Traceability research on magnitude of serum calcium ion measurement system LIU Li¹, CHEN Wei², TAN Tao² (1. Department of Laboratory, Maojian District People's Hospital, Shiyan, Hubei 442012, China; 2. Sichuan Sinew Biotechnology Co., Ltd., Chengdu, Sichuan 611731, China)

【Abstract】 Objective To establish the traceability of inorganic calcium ion measurement system to improve the accuracy of final test results. **Methods** To establish the self-building traceability flow chart of our hospital according to the traceability chain map in the international standards GB/T 21415-2008/ISO 17511:2003. To purchase the reference material (NIST SRM 909b). First, to trace manufacturers working calibrator to reference material. Then, to trace the product calibrator to manufactures working calibrator and calculate the uncertainty of the combination, to complete the tracing of the value of calcium product calibrator made by hospital test. **Results** By testing and comparing the fresh clinical serum samples to ensure the interoperability of reference materials. Meanwhile, SPSS17.0 was adopted for statistical analysis. Under the standard of the 1/4CLIA'88 total allowable error of 97% prediction interval and testing projects, the requirement of value transferring verification was reached. The uncertainty was further determined till completing the tracing job. **Conclusion** The self-building traceability flow chart of our hospital is successful to conduct the value assignment modification of product calibrator and improve the accuracy of reagents test results.

【Key words】 calcium; reference values; regression analysis

随着现代检验医学的迅速发展, 面对目前全自动生化分析仪较多使用的自建检测系统(实验室根据自己的意愿选择仪器、校准品、试剂等而建立的检测系统)如何实现检验结果的溯源性和可比性, 是目前检验界关注和讨论的热点。而实现检验结果准确、可比的有效手段, 是建立和保证不同方法结果的计量学溯源性, 溯源的目的是保证校准的可靠性^[1]。本院以国际标准溯源链式图作为参考自建医院溯源流程图, 以购买的国际二级参考物质 NIST SRM 909b 作为本院一级参考物质, 通过一系列临床比对试验和统计学分析, 成功完成了对产品校准品的量值溯源, 提高了试剂检测结果的准确性。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂 (1) NIST SRM 909b: 2009 年购入, 有效期为 2012 年。(2) 工作校准品: 由四川省新成生物科技有限公司提供。收集新鲜血清高低两个浓度水平, 不添加任何防腐剂, 0.2 μm PP 滤膜过滤后分装成每支 500 μL, 用专用样品管保存于 -80 ℃。(3) 产品校准品: 由四川省新成生物科技有限公司提供, 保存于 2~8 ℃。(4) 临床样本: 在测定范围内, 高中低浓度水平基本均匀分布。(5) 试剂: 由四川省新成生物科技有限公司提供。①新成选择试剂用钙测定试剂(偶氮

砷Ⅲ比色法), 批号为 S-CA001; ②新成常规试剂用钙测定试剂(偶氮砷Ⅲ比色法), 批号为 0809171。(6) 生化分析仪为迈瑞 400 全自动生化分析仪。

1.2 实验方法 依据《GB/T21415-2008/ISO 17511:2003》^[2], 以国际标准溯源链式图作为参考, 自建本院溯源流程图; 以购买的国际二级参考物质 NIST SRM 909b 作为本院一级参考物质, 首先将厂商提供的工作校准品溯源至参考物质, 然后将产品校准品溯源至厂商工作校准品, 从而完成产品校准品的溯源工作。采用 SPSS17.0 软件验证结果, 进行配对 *t* 检验, 并进行线性回归, 要求二者无明显统计学差异, 则线性回归方程截距应不大于 1/4 总允许误差范围^[3]。若达到量值传递要求, 证明工作校准品赋值过程准确有效, 参考物质与工作校准品互通性满足量值传递要求, 然后计算校准品不确定度, 确定工作校准品赋值。采用相同方法完成工作校准品向产品校准品的量值传递, 计算产品校准品不确定度, 最终完成对产品校准品的赋值, 完成无机钙离子检测系统的量值溯源工作。

2 结 果

分别以参考物质校准的选择试剂与工作校准品校准的新成生物试剂测定临床标本 20 份, 同时将参考物质、工作校准品

作为样本,随机插入进行平行测定^[4]。通过临床比对试验和统计学分析,得到线性回归方程 $Y = 1.001X - 0.003$,则: $0.970 < 1.001 < 1.030, 0.003 < 1/4\text{T EA} = 1.75/4 = 0.437\ 5$,达到量值传递验证要求,证明工作校准品赋值过程准确有效,参考物质与工作校准品互通性满足量值传递要求。通过本院自建不确定计算公式得到两个水平的不确定度,工作校准品赋值分别表示为水平Ⅰ: $(2.438 \pm 0.140)\text{ mmol/L}$;水平Ⅱ: $(3.213 \pm 0.190)\text{ mmol/L}$ 。通过相同方法对产品校准品赋值,得到线性回归方程 $Y = 1.005X + 0.151$,则: $0.970 < 1.005 < 1.030, 0.151 < 1/4\text{T EA} = 1.75/4 = 0.437\ 5$,达到量值传递验证要求,证明工作校准品赋值过程准确有效,参考物质与工作校准品互通性满足量值传递要求。通过本院自建不确定计算公式,得到产品校准品的不确定度,赋值表示为 $(3.110 \pm 0.060)\text{ mmol/L}$ 。工作校准品和产品校准品测定结果见表 1;校准结果统计见表 2。

表 1 工作校准品和产品校准品测定结果统计

测试序号	工作校准品 (mmol/L)		产品校准品 (mmol/L)
	水平Ⅰ	水平Ⅱ	
测试 1	2.417	3.279	2.507
测试 2	2.454	3.174	2.460
测试 3	2.488	3.202	2.494
测试 4	2.426	3.190	2.464
测试 5	2.406	3.219	2.535
均值	2.438	3.213	2.492

表 2 校准结果统计

参考物质	校准序号		工作校准品		产品校准品	
	空白	K 值	空白	K 值	空白	K 值
校准 1	6 248	5 407	6 619	4 984	1 746	5 082
校准 2	6 207	5 385	6 604	5 150	1 732	5 017
校准 3	6 191	5 254	—	—	—	—
校准 4	6 177	5 480	—	—	—	—
校准 5	6 315	5 326	—	—	—	—
均值	6 226	5 370	6 612	5 067	1 739	5 050

注:—表示无数据。

3 讨 论

临床检验已成为疾病诊断、危险分析、治疗效果评价和健康状况监测的重要手段,检验结果准确,具有跨时空的可比性,是防病治病和提高人类健康水平的基本需要,也一直是检验医学工作者的工作目标^[5]。目前普遍认为实现这一目标最有效的手段是建立和保证检验结果的溯源性^[6]。让检验结果最好地符合患者实际情况,这也是临床对实验室的基本要求。

国际上有多种溯源方法,本院采用将产品校准品溯源至国际二级参考物质 NIST SRM 909b 的方法。该方法的关键在于以下三点。

3.1 国际二级参考物质 NIST SRM 909b 由于该参考物质是人血清基质,需要在 国外 购得,来源受到限制。同时,参考物质的互通性是临床检验标准化和质量保证中的重要问题,是否具有互通性决定了量值传递是否能进行。根据 EP14-A2^[4]要求,本院采用临床新鲜标本测定结果比对的方法对互通性进行了验证,验证结果说明 NIST SRM 909b 和厂家工作校准品之间存在互通性,能够实现 NIST SRM 909b 向厂家工作校准品

的赋值,完成量值传递过程。

3.2 溯源链的建立 国际上通用的临床检验量值溯源链自上而下各环节的溯源性逐渐降低,而不确定度则逐渐增加,因此,量值溯源过程应尽量减少中间环节。本院根据国际通用溯源链自建了溯源流程图,为溯源实验的开展提供了依据。

3.3 不确定度测定方案 依据《测量不确定度评定与表示指南》建立符合实际的不确定度测定方案,是量值溯源过程的关键步骤。新成生物科技公司结合实际情况综合分析^[7],建立了不确定度测定体系。

3.3.1 量值传递实验过程的结果计算 $C_X = C_T \times K_{PT} \times K_R \times K_{UC}$ 。 C_X 为测定样品的真实浓度; C_T 为连续多次测定样本的平均浓度; K_{PT} 为测定系统的精密密度影响因素(主要由仪器与试剂因素引入,包括比色杯光径误差、光源误差、加样误差等引入,同时还包括试剂本身精密密度等引入); K_R 为参考物质复溶影响因素(主要由复溶参考物质使用的移液管引入); K_{UC} 为参考物质本身不确定度的影响因素(由 NIST SRM 909b 使用说明书直接提供)]。

3.3.2 不确定度来源分析 见表 3。

表 3 不确定度来源分析

因素	不确定度分类	来源分析
C_T	无	多次测定均数不确定,由之后影响因素决定
K_{PT}	A 类	测定系统本身存在不精密密度影响,需对其进行统计学分析。计算各测定系统不精密密度并转化为不确定度 ^[6]
K_R	B 类	复溶参考物质所用的大肚吸管校准后其标示偏差为 $\pm 0.02\text{ mL}$,属正态分布,计算其不确定度; $U = \Delta/1.96$ (不存在产品校准品赋值过程中)
K_{UC}	A 类	参考物质本身不确定度已明确标注,工作校准品也存在不确定度,需根据包含因子对其进行分解计算

实现检验结果量值溯源可通过有证参考品、具有溯源性的校准品与参考方法进行比对、能力验证等多种途径获得^[8]。而校准品的运用是检验工作者经常且必须使用的,因为要保证检测系统的完整性和有效性,离不开校准。由于校准品、质控品和参考物质均为处理过的样本,其物质的特征与人源样本有所不同,在检测中会产生基体效应,如果基体效应显著,又不加分析,会在校准过程中引入系统偏倚。所以,同一校准品在不同检测系统上的校准值可能是不同的,即使是定值质控品,在不同检测系统的赋值也不尽相同^[9]。考虑到样本检测中不精密密度引入的随机误差,因此将 CLIA'88 允许误差的 1/2 作为比对结果系统误差(1/11)的允许限值,应该更为合理。本院为国家二级综合性医院,为提高医院检验结果的准确性,通过参考国际标准溯源链式图自建本院溯源流程图,通过临床比对试验和统计学分析,将产品校准品溯源至国际二级参考物质 NIST SRM 909b,从而提高了新成试剂临床检验结果的准确性。

参考文献

[1] 刘远程,郭永灿,张帮林,等.非配套检测系统溯源性的建立及其确认[J].国际检验医学杂志,2010,31(6):531-532.
[2] 竺澎波,许婉华,陈剑峰,等.自建生化检测系统检测结果溯源性分析[J].现代医院,2008,8(12):46-47.
[3] 王治国.临床检验质量控制技术[M].(下转第 2220 页)

AMF、AMFR mRNA 的表达情况,肝癌Ⅱ、Ⅲ期患者癌组织中 AMF、AMFR mRNA 表达相对于Ⅰ期患者显著升高,Ⅲ期患者肝癌组织中 AMF、AMFR mRNA 表达相对于Ⅱ期患者显著升高,结果见表 2。

表 2 各临床分期肝癌患者癌组织中 AMF/AMFR mRNA 表达情况(̄x±s)

肝癌分期	AMF/β-actin	AMFR/β-actin
Ⅰ期	0.087±0.014	0.140±0.021
Ⅱ期	0.190±0.032*	0.270±0.038*
Ⅲ期	0.310±0.053*△	0.520±0.072*△

注:与Ⅰ期比较,*P<0.01;与Ⅱ期比较;△P<0.01。β-actin 为 β 肌动蛋白。

2.2 淋巴结转移组与未转移组肝癌组织中 AMF、AMFR mRNA 表达水平比较 本实验采用荧光实时定量 PCR 法观察了淋巴结转移组与未转移组肝癌组织中 AMF、AMFR mRNA 的表达情况,淋巴结转移组患者肝癌组织中 AMF、AMFR mRNA 表达相对于未转移组显著升高,结果见表 3。

表 3 淋巴结转移组与未转移组肝癌组织中 AMF/AMFR mRNA 表达水平比较(̄x±s)

组别	AMF/β-actin	AMFR/β-actin
淋巴结未转移	0.120±0.018	0.200±0.034
淋巴结转移	0.270±0.038*	0.470±0.062*

注:与淋巴结未转移组比较,*P<0.01。

3 讨 论

AMF 是 1986 年 Liotta 等从人黑色素瘤细胞株 A2058 中分离出的一种由肿瘤细胞产生并分泌的、能刺激细胞迁移和运动的细胞因子。AMF 在正常细胞和肿瘤细胞均有表达,但在肿瘤细胞中呈过度表达。AMFR 是相对分子质量为 78×10³ 的细胞表面糖蛋白(gp78),属于泛素蛋白酶体系统蛋白,AMF/AMFR 在很多肿瘤组织中表达上调,尤其在膀胱癌、胃癌等侵袭性或转移性肿瘤中表达上调更为明显^[3-4]。既往研究发现,AMF/AMFR 在原发胃癌组织和淋巴结转移灶中的表达水平显著高于癌旁和正常胃黏膜组织。AMF/AMFR 高表达的胃癌患者淋巴结转移率明显增加,且患者的存活率显著低于低表达者,提示 AMF/AMFR 的表达水平与胃癌的侵袭转移及预后密切相关。AMF 与 AMFR 结合后导致 AMFR 磷酸化,激活其耦联的百日咳毒素敏感的 G 蛋白,随后由蛋白激酶 C、酪氨酸激酶及脂氧合酶等介质信息传递,刺激肌醇代谢,引起细胞内 Ca²⁺ 释放,进而激发细胞骨架成分收缩蛋白质的活动导致癌细胞运动,同时能诱导基质降解酶(组织蛋白酶 B)激活和释放,降解细胞外基质成分,形成局部溶解区以构成癌细胞运动通道,促进肿瘤细胞移动^[5]。AMF/AMFR 还能通过

信号转导系统激活蛋白激酶和磷脂酰肌醇激酶,导致血管内皮生长因子受体表达上调,加速新生血管的形成及增强肿瘤的侵袭性,并经正反馈作用在转录水平上调 AMFR 的表达,进一步促进肿瘤细胞运动^[6]。本实验研究发现,相对于肝癌Ⅰ期组,Ⅱ、Ⅲ期组癌组织中 AMF、AMFR mRNA 的表达显著升高;相对于Ⅱ期组,Ⅲ期组癌组织中 AMF、AMFR mRNA 的表达显著升高。说明 AMF、AMFR 的表达与肝癌的严重程度密切相关;在淋巴结转移组中,AMF、AMFR mRNA 的表达显著高于未转移组,说明 AMF、AMFR 的表达与肝癌转移有密切关系。AMF、AMFR 的表达可能对临床判断肝癌的严重程度具有一定的预测价值^[7-8]。

参考文献

[1] Gong W, Jiang Y, Wang L, et al. Expression of autocrine motility factor correlates with the angiogenic phenotype of and poor prognosis for human gastric cancer[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(16): 5778-5783.

[2] Kojic LD, Wiseman SM, Ghaidi F, et al. Raft-dependent endocytosis of autocrine motility factor/phosphoglucose isomerase: a potential drug delivery route for tumor cells [J]. PLoS One, 2008, 3(10): e3597-e3604.

[3] Chiu CG, St Pierre P, Nabi IR, et al. Autocrine motility factor receptor: a clinical review[J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2008, 8(2): 207-217.

[4] Kojic LD, Joshi B, Lajoie P, et al. Raft-dependent endocytosis of autocrine motility factor is phosphatidylinositol 3-kinase-dependent in breast carcinoma cells [J]. J Biol Chem, 2007, 282(40): 29305-29313.

[5] Jiang WG, Raz A, Douglas-Jones A, et al. Expression of autocrine motility factor (AMF) and its receptor, AMFR, in human breast cancer[J]. J Histochem Cytochem, 2006, 54(2): 231-241.

[6] Onishi Y, Tsukada K, Yokota J, et al. Overexpression of autocrine motility factor receptor (AMFR) in NIH3T3 fibroblasts induces cell transformation[J]. Clin Exp Metastasis, 2003, 20(1): 51-58.

[7] 王伟, 杨连粤, 杨治力, 等. 自分泌运动因子受体和 Rho C 基因在肝细胞癌侵袭转移中的作用[J]. 中华肝胆外科杂志, 2004, 10(6): 408-410.

[8] 赵志泉, 张国新, 徐顺福, 等. Autotaxin mRNA 在人肝细胞癌中的表达[J]. 中华消化杂志, 1999, 19(2): 111-113

(收稿日期: 2011-04-09)

(上接第 2218 页)

2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 59.

[4] 江传慧, 陈燕. 检验结果互认面临的问题与对策[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(12): 1234-1235.

[5] 吴平平, 邓琳娜. 自建生化检测系统检测结果溯源性分析[J]. 内蒙古医学杂志, 2009, 41(9): 1099-1101.

[6] 陈文祥. 临床检验参考测量系统与临床检验分析质量保证[J]. 中华检验医学杂志, 2007, 30(4): 478-480.

[7] 汪子伟. 临床实验室的量值溯源和测量不确定度估计[J]. 现代实用医学, 2009, 21(8): 797-798.

[8] 张秀明, 李炜焯, 蓝锴, 等. 自建生化检测系统的量值溯源性和可比性研究[J]. 检验医学, 2007, 22(3): 299-303.

[9] 秦晓光. “检验结果互认”和质量管理[J]. 中华检验医学杂志, 2007, 30(2): 132-135.

(收稿日期: 2011-06-01)