

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2020.09.011

冷冻分离技术在肿瘤标志物质控品研制中的应用*

石建新¹, 蒋 英¹, 段桂开^{2△}, 于 飞¹, 林惠玲¹1. 广东省深圳市福田区慢性病防治院检验科, 广东深圳 518048; 2. 广东省深圳市妇幼保健院
检验科, 广东深圳 518028

摘要:目的 采用冷冻分离技术进行肿瘤标志物室内质控品的制备, 并对其性能进行评价。方法 收集常规检测标本中无传染性的剩余血清, 采用冷冻分离技术制备不同水平的甲胎蛋白(AFP)、癌胚抗原(CEA)、总前列腺特异性抗原(TPSA)质控品, 并根据 CNAS-GL03 标准对自制质控品的稳定性和均匀性进行分析。结果 稳定性分析结果表明, 自制质控品的稳定时间可达 12 个月, 各样品间差异无统计学意义($P>0.05$); 均匀性分析结果表明, 自制质控品的样品间和样品内测定结果差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 采用冷冻分离技术所研制的肿瘤标志物质控品具有良好的均匀性及稳定性, 在临床实验室可用于室内质控。

关键词: 甲胎蛋白; 癌胚抗原; 总前列腺特异性抗原; 质控品; 冷冻分离技术

中图分类号: R-331

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2020)09-1186-03

Preparation of quality control material for tumor maker by freezing separation technology*

SHI Jianxin¹, JIANG Ying¹, DUAN Guikai^{2△}, YU Fei¹, LIN Huiling¹

1. Department of Clinical Laboratory, Futian Center for Chronic Disease Control, Shenzhen, Guangdong 518048, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Shenzhen Health Care Hospital of Women and Children, Shenzhen, Guangdong 518028, China

Abstract: Objective To explore the preparation of an internal quality control material for tumor maker by adopting freezing separation technology, and then to investigate its performance. **Methods** Pooled routine noninfectious residual serum was used as the medium for the quality control material for alpha-fetoprotein (AFP), carcinoembryonic antigen (CEA), total prostate-specific antigen (TPSA) preparation. By adopting freezing separation technology, quality control materials with different tumor maker levels were prepared. The homogeneity and stability of the preparations were evaluated according to the CNAS-GL03. **Results** In the stability evaluation of preparations, the results showed that the stable period of the preparations was 12 months and there was no significant difference between samples ($P>0.05$). In the homogeneity evaluation of preparations, the results showed that the differences within samples and between samples were not significant ($P>0.05$). **Conclusion** The prepared tumor maker control material with freezing separation technology have sound homogeneity and stability, which could be applied for the internal quality control in clinical laboratories.

Key words: alpha-fetoprotein; carcinoembryonic antigen; total prostate-specific antigen; quality control material; freezing separation technology

肿瘤标志物的检测在辅助诊断肿瘤、观察疗效等方面具有重要意义, 做好室内质控(IQC)是确保肿瘤标志物检测结果能否发出的前提条件, 而质控品又是 IQC 的关键因素, 目前国内肿瘤标志物质控品多使用进口产品, 但由于进口肿瘤标志物质控品成本高昂, 订货周期长, 而国产质控品又存在价格偏高、质量参差不齐的情况, 导致肿瘤标志物检测 IQC 难以规范进行。为节约质控成本, 提高检测质量, 很多学者开始进行自制质控品的相关研究^[1-4], 但在质控品制备方法上还存在高值质控品原料难以收集、添加剂过多、

制备成本偏高等问题, 针对这些问题, 本研究以甲胎蛋白(AFP)、癌胚抗原(CEA)、总前列腺特异性抗原(TPSA)为例, 探索采用冷冻分离法进行肿瘤标志物质控品的制备是否可行, 现报道如下。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂 仪器为美国贝克曼 DxI 800 自动分析仪, 配套检测试剂均采用美国贝克曼公司产品。配套质控品采用美国 BIO-RAD 质控品。乙二醇(AR 级)为天津永大公司提供的分析纯试剂。

1.2 方法

* 基金项目: 广东省深圳市科技研发资金项目(JCYJ20170306143008348)。

作者简介: 石建新, 男, 副主任技师, 主要从事临床检验诊断学研究。△ 通信作者, E-mail: 1007036009@qq.com。

1.2.1 质控血清的制备 除溶血、黄疸、乳糜血标本外,每天收集临床实验室 AFP、CEA、TPSA 水平升高,同时乙型肝炎表面抗原(HBsAg)、丙型肝炎病毒(HCV)、人类免疫缺陷病毒(HIV)和梅毒项目检测结果均为阴性的剩余血清标本,置于-20℃冰箱保存。当收集到足够血清后统一混匀,采用离心机以 3 000 r/min 离心 10 min,经过滤处理后,剩余血清放在-20℃冰箱冷冻保存 24 h,再静置于 4℃冰箱缓慢解冻,期间不能摇动,待全部解冻后缓慢吸取上 3/4 血清单独分装,作为低值质控血清原液,剩余 1/4 的血清作为高值质控血清制备的原液。分别混匀后取样测定其 AFP、CEA、TPSA 水平,并观察是否达到目标水平,如未达目标水平,可将分离血清放置于-20℃冰箱再进行冷冻处理,重复上面的冷冻分离步骤,直到血清原液达到目标水平。分别在高、低值质控血清原液中加入适量 30%乙二醇,然后通过高、低值血清原液配比来进行最终调节,最后制成符合要求的质控品,并用 0.2 μmol 无菌过滤器进行过滤。以 0.5 mL 为单位,用无菌西林瓶将自制质控品进行分装,封口保存于-20℃冰箱备用。

1.2.2 性能评价方法 所有检测均是在仪器保养

后,对测试项目进行重新校准,并在 BIO-RAD 质控品处于在控条件下进行。(1)均匀性测定^[4]:根据国家 CNAS-GL03 检测方法,随机取 10 支自制质控品,依次编号后分别按 1~10 和 10~1 的次序检测 AFP、CEA、TPSA 项目 2 次,通过检测结果计算出 *F* 值。若得到的 *F* 值小于 *F* 临界值($\alpha=0.05$),则表明样品是均匀的,样品间和样品内差异无统计学意义($P>0.05$)。(2)稳定性测定^[4]:根据国家 CNAS-GL03 检测方法,质控品制好后,随机取 6 支自制质控品,每支重复检测 AFP、CEA、TPSA 项目 2 次,以此作为各项目即刻均值,再分别在第 1、3、6、9、12 个月随机取 6 支自制质控品,参照以上同样的方法进行测定,再分别取各项目均值与其即刻均值比较,若计算得到的 *t* 值小于 $t_{0.05(10)}$,说明样品之间差异无统计学意义($P>0.05$),样品是稳定的。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行数据处理及统计分析,采用独立样本 *t* 检验和单因素方差分析法进行比较,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 均匀性测定 结果见表 1。

表 1 自制不同水平肿瘤标志物质控品均匀性测定结果 (ng/mL)

质控品 编号	AFP 低值		AFP 高值		CEA 低值		CEA 高值		TPSA 低值		TPSA 高值	
	第 1 次	第 2 次	第 1 次	第 2 次	第 1 次	第 2 次	第 1 次	第 2 次	第 1 次	第 2 次	第 1 次	第 2 次
1	8.92	9.08	69.63	68.83	3.22	3.32	19.23	19.45	2.72	2.69	12.12	11.98
2	9.18	8.95	68.44	67.42	3.31	3.19	19.35	19.78	2.68	2.64	11.86	12.12
3	9.12	9.07	67.58	68.55	3.18	3.23	19.88	19.23	2.82	2.76	11.95	12.06
4	8.97	9.09	67.96	69.52	3.23	3.29	19.78	20.16	2.77	2.65	11.87	11.96
5	8.89	9.05	68.72	68.44	3.26	3.26	20.11	19.87	2.76	2.79	11.94	12.14
6	9.08	9.13	69.33	69.21	3.28	3.17	19.52	19.44	2.69	2.76	11.88	11.96
7	9.12	8.95	68.49	70.21	3.31	3.19	19.47	20.15	2.73	2.71	12.21	12.04
8	9.03	9.02	67.87	68.35	3.17	3.24	19.87	19.25	2.77	2.71	12.07	12.21
9	9.09	8.92	68.46	69.16	3.18	3.16	19.46	19.84	2.74	2.68	11.85	11.97
10	9.07	8.94	67.33	67.87	3.26	3.22	20.13	20.03	2.78	2.73	12.03	12.23
平均值	9.03		68.57		3.23		19.7		2.73		12.02	
<i>F</i>	0.38		1.67		0.63		1.32		1.56		1.26	
<i>P</i>	>0.05		>0.05		>0.05		>0.05		>0.05		>0.05	

表 2 自制不同水平肿瘤标志物质控品稳定性测定结果 ($\bar{x}\pm s$, ng/mL)

保存时间	AFP		CEA		TPSA	
	低值	高值	低值	高值	低值	高值
即刻	9.03±0.11	68.66±0.81	3.23±0.04	19.73±0.34	2.73±0.06	12.00±0.16
第 1 个月	9.02±0.08	68.53±0.70	3.20±0.03	19.66±0.42	2.73±0.08	12.06±0.15
第 3 个月	9.08±0.18	68.55±0.80	3.21±0.05	19.90±0.40	2.74±0.07	12.06±0.14
第 6 个月	9.04±0.10	68.69±0.72	3.19±0.06	19.58±0.44	2.74±0.07	12.05±0.12
第 9 个月	8.98±0.25	68.55±0.75	3.21±0.04	19.76±0.40	2.70±0.07	12.04±0.13
第 12 个月	9.04±0.19	68.63±0.73	3.21±0.05	19.75±0.40	2.75±0.07	12.06±0.18

2.2 稳定性测定 将自制质控品保存 1、3、6、9、12 个月测定的均值分别与即刻测定得到的均值进行比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 2。

3 讨论

肿瘤标志物是肿瘤细胞本身存在或分泌的特异性物质,绝大多数存在于恶性肿瘤中,血清中肿瘤标志物的检测对肿瘤预警及早期诊断具有重要的科学意义^[5-6]。在实验室质量管理体系中,IQC 是一个重要环节,而质控品是保证 IQC 工作的重要物质基础。国家《临床实验室定量测定室内质量控制指南》中明确指出,实验室可以进行质控品自制。理想的质控品通常应具有以下特征:人血清基质,无传染性,添加剂的数量尽可能少,瓶间变异小和稳定时间长^[7]。其中稳定性和均匀性是评价质控品的主要指标^[3]。

本研究结果显示,自制肿瘤标志物质控品的均匀性和稳定性良好。均匀性检测得到的 F 值均小于 F 临界值 [$F_{0.05(9,10)} = 3.02$],说明样品间和样品内差异无统计学意义($P > 0.05$),样品是均匀的;自制质控品在第 1、3、6、9、12 个月测定的均值分别与即刻测定的均值比较,计算的 t 值均小于 $t_{0.05(10)}$ (1.812),说明样品之间在 1 年以内差异无统计学意义($P > 0.05$),样品是稳定的。自制质控品均匀性和稳定性符合相关要求^[4,7]。

在质控品的制备方式上,本研究利用实验室内剩余血清,结合冷冻分离法自制了肿瘤标志物质控品,避免了基质效应的干扰;在传染性检测方面,本研究直接收集临床上 HBsAg、HCV、HIV 和梅毒项目检测结果均为阴性的剩余血清标本,节省了质控品传染性检测的制备成本;制备成液体质控品而非固体干粉质控品减少了样品复融带来的瓶间差异;自制肿瘤标志物质控品解冻后外观清澈透明,未见明显浑浊及沉淀出现,稳定性和均匀性良好,能够满足 IQC 工作要求。同时,本研究主要探讨利用冷冻分离法制备肿瘤标志物质控品,这和以往传统的通过人为添加高、低值质控品原料来调节自制质控品水平的方式有所区别^[8-9],能够减少质控品制作成本和基质效应的影响。冷冻分离法是一种通过利用冷能将溶液的溶质以固相形式析出,并从液相中逐渐分离,以达到使溶液净化或者浓缩目的的方法,其主要原理是利用冷能对溶液溶质迁移的影响,冷冻温度越接近冰点时,血清中固液界面向前推移的速度就越慢,溶液溶质就有足够的时间进行迁移扩散,最终使大量的溶质聚集在很小的体积内,致使浓度急剧增大^[10]。国内外多项研究曾

对冷冻分离技术进行过相关研究^[11-13],但目前主要还是用于海水淡化和食品工业等领域,本研究探索将该技术用于肿瘤标志物质控品的制备,以解决一般医院高值质控品血清原料难以获取的问题。本研究结果显示,利用冷冻分离技术能够制备出符合要求的肿瘤标志物质控品,该方法具有操作简单、原料来源方便、不需要特殊设备、成本低廉等优势,而且对血清成分不易造成破坏,适合在各级医院推广使用。

参考文献

- [1] 崔小峰,刘蕊,杨彬. 血清蛋白质控品的研制及室内质评的调查[J]. 检验医学与临床,2013,10(20):2671-2672.
- [2] 崔婷,马建锋. 以患者新鲜血清标本制备室内质控品的应用研究[J]. 检验医学与临床,2014,11(6):737-738.
- [3] 袁咏梅,刘和录,何亚,等. 自制 G6PD 室内质控物稳定性及瓶间均一性评价[J]. 国际检验医学杂志,2013,34(13):1733-1735.
- [4] 中国合格评定国家认可委员会. 能力验证样品均匀性和稳定性评价指南:CNAS-GLO3[S]. 北京:中国合格评定国家认可委员会,2006.
- [5] MAJKIC-SINGH N. What is a biomarker? From its discovery to clinical application[J]. Med J Biochem,2011,30(3):186-192.
- [6] PERFEZOU M, TURNER A, MERKOCI A. Cancer detection using nanoparticle-based sensors[J]. Chem Soc Rev,2012,41(7):2606-2622.
- [7] 王治国. 临床检验质量控制技术[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社,2014:327.
- [8] 唐立萍,张瑞锦,居漪,等. 复合血脂质控品的制备及性能评价[J]. 检验医学,2013,28(5):430-433.
- [9] 矫丽媛,才蕾,赵晓妮,等. 前列腺特异抗原质控品的制备与评价[J]. 临床检验杂志,2016,34(1):64-66.
- [10] 马艳丽. 水溶液冷冻过程中溶质迁移影响因素的研究与分析[D]. 沈阳:东北大学,2013.
- [11] UMER S, JAMIL A, WAHEEDUZ Z. Forced migration of soluble and suspended material by freezing front in aqueous systems[J]. J Hydro-environ Res, 2012, 6(3): 221-226.
- [12] 杜国银. 冷冻法处理溴氨酸水溶液及 Ullmann 缩合反应生产废水的初步研究[D]. 天津:天津城市建设学院,2007.
- [13] 刘明言,余根,王红. 中药提取液浓缩新工艺和新技术进展[J]. 中国中药杂志,2006,31(3):184-187.

(收稿日期:2019-08-14 修回日期:2019-12-13)