

3 讨 论

实验室间质量评价是由外部机构客观评价参加实验室间质量评价活动的各实验室对外部质控样品的检测结果,其作为一种重要的质量控制手段可以帮助提高实验室的检验质量,通过分析实验中存在的问题,采取相应的措施^[3],以达到使实验结果更为准备和可靠。

广西地区有 120 家各类医疗机构与性病防治机构参加 2012 年度梅毒实验室间质量评价活动,其中性病防治机构 42 个,综合医院 78 个。并且覆盖全区所有 14 个地市,有些地市参加单位较多,有些地市还偏少,这也和各个地市梅毒流行情况、医疗机构分布不均的因素有关。在参加的 120 家梅毒实验室中,开展 RPR 项目的有 41 家(34.2%),开展 TRUST 的有 79 家(65.8%);开展 TPPA 的有 67 家(55.8%),开展 TP-ELISA 的有 48 家(40.0%),开展其他项目如化学发光法和免疫层析法的有 5 家(4.2%)。非梅毒螺旋体抗原血清学试验中以 TRUST 方法为主,占 65.8%,梅毒螺旋体抗原血清学试验开展的项目中 TPPA 比例超过半数,为 55.8%,在不同类型实验室中,综合医院还是以 TP-ELISA 方法更为多见,另外还发现了个别单位采用化学发光法及免疫层析法。就项目开展情况来看,由于 RPR 试剂厂家目前国内就一家,所以开展 TRUST 更为普及,而就梅毒螺旋体抗原血清学试验来说,标本量少的单位建议开展以 TPPA 为主,而针对综合医院标本量大的情况可采用 ELISA 方法开展为主。

经过本次项目统计结果发现,梅毒实验室开展的项目必须配备的仪器设备有一定比例未符合要求,在 120 家参评单位中,非梅毒螺旋体抗原血清学试验配套使用的水平旋转仪有 27 家(22.5%)未配备。说明很多单位的梅毒实验室在项目开展方面的理论知识以及配套仪器的要求不熟悉或者了解不够有关。在参评的 120 家单位并都反馈结果中,成绩 100 分的 20 家(16.6%),90~99 分的 63 家(52.5%),80~89 分的 26 家(21.7%),80 分以下的有 11 家(9.2%),就标本成绩统计来看,80 分以上的有 109 家,合格率为 90.8%。性病防治机构合

• 质控与标规 •

格率为 91.4%,综合医院合格率为 87.9%。说明全区梅毒实验室检测的总体水平还有待进一步提高,特别是综合医院及县级性病防治机构的梅毒检测水平偏低,应在理论和操作培训方面加大力度以提高梅毒检测的准确性。非梅毒螺旋体抗原血清学定性试验中,无论使用何种试剂,定性试验的符合率为 99.2%;而定量试验的符合率为 56.7%,在定量试验的符合率方面各类医疗机构符合率都偏低。梅毒螺旋体抗原血清学试验中,其符合率为 99.2%,其中发现有一个单位出现一个标本不符合预期结果的情况,这需要提高重视个别单位在梅毒螺旋体抗原血清学试验的检测准确性。在各个标本检测结果统计显示,3 个非梅毒螺旋体抗原血清学试验阳性标本中,定量试验结果准确性明显偏低。

通过本次梅毒血清学检测等项目的室间质量评价研究,了解了现阶段广西区梅毒实验室在梅毒检测中方法的应用、试剂使用和仪器设备使用情况,本次活动参加单位数基本能体现目前广西梅毒实验室的水平,但并不能完全反映我区梅毒实验室检测的全部情况。所以我们将在此基础上,扩展到更多的参评单位,使梅毒实验室室间质量评价活动进一步完善,从而提高我区的梅毒实验室检测质量水平,为我区开展对梅毒的预防和控制措施提供可靠的科学依据。

参考文献

- [1] 尹跃平. 性传播疾病实验室诊断指南[M]. 上海:上海科技出版社,2007:1-18.
- [2] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会. GB/T 20470-2006 临床实验室室间质量评价要求[S]. 北京:中国标准出版社,2006.
- [3] 王治国. 临床检验质量控制技术[M]. 北京:人民卫生出版社,2004:237-270.

(收稿日期:2012-12-26)

ICP-AES 测定人发中钙质量分数的不确定度评价

金银平

(湖北省云梦县人民医院检验科,湖北孝感 432500)

摘要:目的 评价电感耦合等离子体发射光谱法(ICP-AES)测定人发中钙质量分数的不确定度。方法 建立 ICP-AES 测定人发中钙的数学模型,对其中各个参数进行不确定度来源分析,分别对 A 类不确定度或 B 类不确定度进行评定。对各不确定度分量进行合成和扩展,得到钙质量分数的不确定度。结果 样品质量的不确定度为 5.5×10^{-5} g,有证标准物质和标准曲线非线性的不确定度为 0.38%,容量瓶和移液管的允许误差而导致的体积不确定度为 0.058 mL,测量重复性引起的不确定度为 0.174 9 mg/L。结论 测量重复性引起的不确定度以及标准物质和标准曲线非线性引起的不确定度是不确定度的主要来源。

关键词:不确定度; 钙; 人发; ICP-AES

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.12.040

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)12-1573-03

随着医学检验的不断发展,临床上对于检验的质量要求也在不断提高,因此不确定度在医学检验中逐渐受到关注^[1-3]。本文对电感耦合等离子体发射光谱法(ICP-AES)测定头发中钙质量分数的不确定度进行了探讨^[4-5],该评定结果可直接应用于日常的检测工作。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂 Prodigy 型电感耦合等离子体发射光谱仪,

中阶梯光栅,水平和垂直双向观测系统,波长范围 165~800 nm,高频发生器频率 40.68 MHz。微波消解仪:上海屹尧微波化学科技有限公司 EXCEL 型微波化学工作平台。硝酸:优级纯;钙标准溶液:1 g/L,用前逐级稀释;水为高纯蒸馏水。所用容器均在 4 mol/L HNO₃ 中浸泡 48 h 以上。

1.2 方 法

1.2.1 样品的采集与处理 统一剪取采集脑枕后距发根 1

cm 的头发约 2 g,用 2% 蜂花洗发水超声清洗 15 min,再用清水多次洗涤后,用高纯蒸馏水清洗 3 次,烘干,准确称取剪碎混匀的头发样品 1.000 g 置于 100 mL 聚四氟乙烯微波消解罐中,加 5 mL HNO₃,置于微波消解仪内,按设定条件消解后定容于 100 mL 容量瓶中待测。同时配制样品空白待测。

1.2.2 仪器工作条件 功率 1.0 kW,冷却气流量 20 L/min,辅助气流量 0.3 L/min,雾化器压力 0.2 mPa,样品提升量 1.2 mL/min,积分时间 2 s,水平观测。

1.2.3 样品的测定 根据样品中钙元素含量,配制含钙质量浓度为 0.00、1.00、10.00 mg/L 标准溶液系列。选择共存元素谱线干扰小、检出限低、信背比高的谱线作为分析谱线,用 ICP-AES 测定经消解罐消解后的样品中各元素的含量。

2 不确定度评估

2.1 数学模型 ICP-AES 测定人发中钙元素含量的过程,测定结果与有关参数有如下函数关系:
$$W = \frac{c_0 \times V \times d}{m}$$

式中:W 为样品中钙元素的含量,mg/kg;c₀ 为样品消解液中钙元素的浓度,mg/L;V 为样品消解液的定容体积,mL;d 为稀释因子;m 为样品取样量。

2.2 测量不确定度来源分析 通常产生不确定度的因素包括实验环境、分析方法、标准物质、检测仪器和人员操作,其中分析方法所产生的不确定度情况较复杂,并且有一定的随机性,一般比较难以量化,通常用加标回收实验来加以校正。本文仅分析下列因素所产生的不确定度:(1)样品质量 m 的不确定度 U₁;(2)有证参考(标准)物质(CRMs)和标准曲线非线性等因素引入的标准不确定度分量 U₂;(3)由于容量瓶和移液管的允许误差而导致的体积不确定度 U₃;(4)测量重复性引起的不确定度 U₄。

2.3 测量不确定度分量的评定

2.3.1 U₁ 的计算 (1)天平称量的不确定度 U₁(k):在实际测定过程中是用电子天平称取样品的质量,电子天平的示值误差会传递到最终的结果中去。使用的天平经校准,根据仪器检定证书其示值误差引起的扩展不确定度为 U=0.1 mg,k=2。

进行 B 类评定,则有:U₁(m) = $\frac{U}{k} = 0.5 \times 10^{-4}$ (g)。(2)天平称量重复性引入的不确定度分量 U₁(m):用天平重复测量同一砝码 9 次,得天平的极差 R 为 0.000 2 g,称量数据呈正态分布,查表^[1]得 k=2.97,对天平进行 A 类评定,U₁(m) = $\frac{R}{\sqrt{n} \times k} = \frac{0.000 2}{\sqrt{9} \times 2.97} = 2.2 \times 10^{-5}$ (g)。将 U₁(k) 和 U₁(m) 两个分量合成,得 U₁ = $\sqrt{U_1^2(k) + U_1^2(m)} = 5.5 \times 10^{-5}$ g。

2.3.2 U₂ 的计算 有证参考(标准)物质(CRMs)和标准曲线非线性等因素引入的标准不确定度分量 U₂。采用 Merck 公司提供的 1 000 mg/L 有证钙标准溶液,证书标明该溶液不确定度为 0.1%。由于仪器的测定工作是建立在标准曲线的基础

上,而标准曲线的可靠性则是由有证标准物质(CRMs)来确定的。通过对标准曲线的测定,得到回归方程为:Conc = 6.875 9 × 10⁻⁶ × I - 4.029 2 × 10⁻² (r=1.000 0)。校准曲线非线性引起的误差限,见表 1。在相同条件下重复测定 8 次,每次计算的误差限分别为:0.1%、0.3%、0.1%、0.2%、0.3%、0.3%、0.1%、0.4%。由次可得不确定度半宽度为 0.4%,可认为其符合均匀分布,取包含因子 k=√3,则该标准曲线非线性引起的标准不确定度分量为:U₂ = (0.3%)² + (0.4%/√3)² = 0.38%。对 3 组数据进行 8 次独立测量,因此自由度 v₂ 为 23。误差限为 0.1%。

表 1 校准曲线非线性引起的误差限

标准溶液浓度(mg/L)	仪器读出浓度(mg/L)	浓度差值(mg/L)	相对误差(%)
0.00	0.001	0.001	0.1
1.00	0.999	-0.001	0.1
10.00	10.000	0.000	0.0

2.3.3 U₃ 的计算 由于容量瓶和移液管的允许误差而导致的体积不确定度 U₃。容量瓶已经过检定,根据检定证书,100 mL 容量瓶的误差为 0.06 mL。所使用的其他容量瓶经过对比,根据 JJG196-2006 中的规定,A 级 100 mL 容量瓶的容量允许误差为 ±0.10 mL,按均匀分布进行 B 类评定,取 k=√3,则由于容量瓶容量允许误差而导致的定容体积的不确定度 U₃(V₁)为:U₃(V₁) = $\frac{0.10}{\sqrt{3}} = 0.58$ mL

移液管已经过检定,根据检定证书,1 mL 单标移液管实际容量为 0.999 mL。根据 JJG196-2006 中的规定,A 级 1 mL 容量瓶的容量允许误差为 ±0.008 mL,按均匀分布进行 B 类评定,取 k=√3,则由于容量瓶容量允许误差而导致的定容体积的不确定度 U₃(V₂)为:U₃(V₂) = $\frac{0.008}{\sqrt{3}} = 0.004 6$ mL。所以:

$$U_3 = \sqrt{U_3^2(V_1) + U_3^2(V_2)} = 0.005 8$$
 mL。

2.3.4 U₄ 的计算 为获得重复性测量的不确定度,笔者用一个有证标准物质对仪器进行校准曲线的建立,接着进行样品的测试,未知样重复测定 12 次结果分别为(mg/L):11.605 1、11.591 7、11.705 1、11.642 9、11.805 6、11.801 9、11.728 7、12.022 2、11.982 6、11.992 2、12.078 0、11.968 4。经 Dixon、Grubbs 检验,上述数据不存在显著性异常值。(1)重复性测量的平均值: $\bar{x} = 11.827 0$ mg/L。(2)单次测量的标准差(s)为:
$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{12} (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} = 0.174 9$$
 mg/L。(3)测得数据呈正态分布,按 A 类评定,根据贝尔法,重复性测量的标准不确定度分量 U₄,U₄=s=0.174 9 mg/L,v₄=11。(4)标准不确定度分量汇总表(表 2)将所有的不确定度计算和结果汇总其中。

表 2 标准不确定度分量汇总表

序号	标准不确定度分量 U(x _i)	不确定度来源	不确定度值	自由度(v)
1	U ₁	样品质量 m 的不确定度	5.5 × 10 ⁻⁵ g	∞
2	U ₂	有证标准物质和标准曲线非线性的不确定度	0.38%	23
3	U ₃	容量瓶和移液管的允许误差而导致的体积不确定度	0.058 mL	∞
4	U ₄	测量重复性引起的不确定度	0.174 9 mg/L	11

2.5 合成标准不确定度的计算 根据以下公式计算合成标准不确定度:

$$U_w = \sqrt{\left(\frac{\partial W}{\partial c_0}\right)^2 \times U_1^2 + \left(\frac{\partial W}{\partial V}\right)^2 \times U_3^2 + \left(\frac{\partial W}{\partial m}\right)^2 \times U_1^2 + \left(\frac{c_0 V d}{m}\right)^2 \times U_2^2}$$

$$\text{式中传播系数} \frac{\partial W}{\partial C_0} = \frac{V \times d}{m} = 100 \text{ mL/g}$$

$$\frac{\partial W}{\partial V} = \frac{c_0 \times d}{m} = 11.827 \text{ mL/(L} \cdot \text{g)}$$

$$\frac{\partial W}{\partial m} = \frac{c_0 \times V \times d}{m^2} = 11.827 \text{ mL/g}^2$$

将上述数据代入公式中,得 $U_w = 45.34 \text{ mg/kg}$ 。

2.6 合成标准不确定度的有效自由度 $\nu_{eff} = 496$,以 $P=0.95$,查 t 分布表,得包含因子 k 约为 1.960。

2.7 扩展不确定度 U 的评定 $U = kU_w = 1.960 \times 45.34 = 88.9 \text{ mg/kg}$ 。

2.8 测量不确定度的报告与表示 ICP-AES 测定人发中钒含量为: $(1182.7 \pm 88.9) \text{ mg/kg}$, $k=2$,置信区间 $P=0.95$ 。

3 结 论

本实验结果表明:使用微波消解-ICP-AES 测定人发中钒元素质量分数具有快速简便、数据稳定可靠的优点。其不确定

• 质控与标规 •

来源主要来源为测量重复性引起的不确定度以及标准物质和标准曲线非线性引起的不确定度。

参考文献

- [1] 胡力涛,何法霖,王薇,等. 临床检验测量不确定度的评定[J]. 临床检验杂志,2011,29(9):658-659.
- [2] 张佳愉,葛英杰,朱晓超. 原子荧光法测定头发中砷的不确定度分析[J]. 职业与健康,2009,25(14):1479-1481.
- [3] 刘文彬,居漪. 常规化学项目总误差和不确定度比较研究[J]. 检验医学,2012,27(12):1002-1006.
- [4] 中国实验室国家认可委员会. 化学分析中不确定度的评估指南[M]. 北京:中国计量出版社,2002.
- [5] 国家质量技术监督局. JJF 1059-1999 测量不确定度评定与表示[S]. 北京:中国计量出版社,1999.

(收稿日期:2013-02-18)

实时荧光定量 PCR 法检测 HCV-RNA 测量不确定度评价

庄健海,卓雪芽,谢小梅,何 娟,罗 娜,黄星华

(佛山市中医院检验科,广东佛山 528000)

摘要:目的 探讨对实时荧光定量 PCR 法测 HCV-RNA 测量不确定度评定的合理方式。方法 依据 Nordtest 准则,利用实时荧光定量 PCR 法检测 HCV-RNA 室内质控及室间质评标本,收集 2012 年 4~9 月的 HCV-RNA 室内质控数据及 2010~2012 年室间质评结果。计算其批内及批间变异系数、系统偏倚变异系数,确定其相应的标准不确定度分量,进而计算出其扩展不确定度。结果 同一天内 12 次 HCV-RNA 室内质控的检测批内变异系数为 2.55%,2012 年 4~9 月共 155 个工作日的 HCV-RNA 检测批间变异系数为 5.80%;2010~2012 年卫生部临检中心室间质评共 30 个检测数据的系统偏倚变异系数为 5.04%,剔除 8 个检测为零的数据后重新计算变异系数为 5.97%。批内、批间及系统偏倚的因素合成后,扩展不确定度为 16.18%,剔除 8 个检测为零的数据后为 17.16%。结论 对实时荧光定量 PCR 法测 HCV-RNA 测量不确定度的评价,利用现有室内外质控数据,无须额外测试,简单易行,是医学检验实验室较为实用的一种测量不确定度评价方式,但数据的纳入应考虑方法的特殊性。

关键词:实时荧光定量 PCR 法; HCV-RNA; 测量不确定度; 评定

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.12.041

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)12-1575-03

近十几年,测量不确定度(measurement uncertainty)的概念逐渐被引入检验界,并逐步取代误差理论。误差的定义为测量结果减去真值,因为真值的不可测性,导致其只是一种理想的数据,只能是一种估算值,结果间可比性较差,这种误差理论缺陷大大限制了其应用的范畴。测量不确定度代表的是检测指标的可靠性,提供测量值的分散性信息,是与测量结果相联系的参数。中国合格评定国家认可委员会按照对检测结果可信性、可比性及可接受性的要求,在 2011 年颁布了 CNAS-CL07《测量不确定度的要求》^[1]以取代原有的 CNAS-CL07《测量不确定度评估和报告通用要求》,规定申请 ISO15189 认可的检测实验室对检测报告必要且可能时提供测量结果的不确定度。本文基于对 CNAS-CL07《测量不确定度的要求》和 CNAS-GL05《测量不确定度要求的实施指南》^[2]的理解,探讨依据 Nordtest 准则^[3]下对实时荧光定量 PCR 法测 HCV-RNA 测量不确定度的评价,现报道如下。

1 材料与与方法

1.1 材料 室内质控物购自广东省临检中心(批号 201203 S4);室间质评质控物来自卫生部临检中心 2010~2012 年分发,质控物编号分别为:1011、1012、1013、1014、1015、1021、1022、1023、1024、1025(2010 年);1111、1112、1113、1114、1115、1121、1122、1123、1124、1125(2011 年);1211、1212、1213、1214、1215、1221、1222、1223、1224、1225(2012 年)。

1.2 仪器与试剂 采用由美国应用生物系统公司生产的 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪。HCV-RNA 试剂由上海科华生物工

程股份有限公司提供。

1.3 方法

1.3.1 室内质控数据 来自 2012 年 4~9 月每个工作日记录 HCV-RNA 室内质控数据,对每个数据(单位: IU/mL)取对数并绘制质控图。

1.3.2 室间质评数据 2012 年度本科室参加卫生部临检中心室间质评回报信息。

1.3.3 确定标准不确定度分量 根据 Nordtest 准则^[3],主要用不精密度及系统偏倚来评估检测项目的测量不确定度。室内质控的批内及批间变异系数可反映检测项目的总不精密度的标准不确定度,室间质评数据则主要反映结果偏倚的标准不确定度。

1.3.4 合成标准不确定度(U_c)的计算 合成标准不确定度的计算公式(见公式 1),按其传播的规律,评定的不精密度和结果偏倚两种因素相关极弱,可取 $r=0$, $\frac{\partial f}{\partial x_i} = 1$,公式 1 可简化为公式 2,可将批内、批间、系统偏倚及除此以外的因素合并成合成标准不确定度,则有公式 3^[4],在这里 A 类不确定度的评定主要依据对室内外质控观测列数据计算出不精密度和偏倚的标准不确定度, B 类不确定度主要依据经验、资料记载或有关信息等非统计学方法,说明书未有提及相关资料,故其他因素可忽略,即公式可进一步简化成公式 4。

$$U_c(y)^2 = \sum_{i=1}^n \left(\frac{\partial f}{\partial x_i} = 1\right) U^2(x_i) + 2 \sum_{i=j}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n \frac{\partial f}{\partial x_i} \frac{\partial f}{\partial x_j} \cdot r(x_i, x_j) \cdot U$$