

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

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

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

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 测定人发中钬含量为: $(1182.7 \pm 88.9) \text{ mg/kg}$, $k=2$,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 测定人发中钬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 娴,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。

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

$(x_i)U(x_j)$ (公式 1)

$$U_c(y) = \sqrt{\sum_{i=1}^n U^2(x_i)}$$
 即

$$U_c(y) = \sqrt{U^2(x_1) + U^2(x_2) + \dots + U^2(x_n)}$$
 (公式 2)

$$U_c(y) = \sqrt{CV_w^2 + CV_b^2 + CV_{sys}^2 + CV_{ah}^2}$$
 (公式 3)

$$U_c(y) = \sqrt{CV_w^2 + CV_b^2 + CV_{sys}^2}$$
 (公式 4)

1.3.5 扩展不确定度(U)的计算 扩展不确定度计算公式 $U = kU_c(y)$, 正态分布下 95% 置信概率时 $k=2$, 即 $U = 2U_c(y)$, 则有公式 5。

$$U = 2 \times \sqrt{CV_w^2 + CV_b^2 + CV_{sys}^2}$$
 (公式 5)

1.4 统计学处理 室内质控及室间质评数据取对数进行统计学分析, 统计数据用 SPSS15.0 软件进行处理。

2 结 果

2.1 室内质控数据

2.1.1 将 HCV-RNA 室内质控物在同一天进行 4 次检测, 每次 3 孔, 安排在不同孔位扩增, 获得 12 个检测数据, 分别为:

5.22、5.39、5.48、5.51、5.34、5.54、5.57、5.70、5.41、5.51、5.68、5.35, 12 次 HCV-RNA 室内质控物检测结果总和为 60.35, 批内变异数为 2.55%。

2.1.2 2012 年 4~9 月共 155 d 的 HCV-RNA 室内质控检测数据, 见表 1。155 d HCV-RNA 检测结果总和为 856.32, 批间变异系数为 5.80%。

2.2 室间质控数据 2010~2012 年 HCV-RNA 室间质评数据, 见表 1。3 年的差值百分比总和、 $(x_\theta - \bar{x}_{\theta 1})^2$ 总和及 $(x_\theta - \bar{x}_{\theta 2})^2$ 总和分别为 54.77、712.68 及 676.32; 3 年的差值百分比均值($\bar{x}_{\theta 1}$)为 1.83%, 相应的差值百分比标准差($S_{\theta 1}$)为 4.96%, 剔除测定值为零的数据后的差值百分比均值($\bar{x}_{\theta 2}$)为 2.49%, 相应的 $S_{\theta 1}$ 为 5.68%。系统偏倚的标准不确定度计算

按如下公式进行: $U_{sys} = CV_{sys} = \sqrt{(\frac{\theta}{2})^2 + S_i^2}$, 则计算出系统

便宜的不确定度为 5.05%, 剔除 8 个检测为零的数据后, 重新计算系统偏倚的变异系数为 5.79%。

表 1 2010~2012 年 HCV-RNA 室间质评信息

年度	批号	测定值	靶值	差(10 ⁻²)	差值百分比 (θ, %)	$x_\theta - \bar{x}_{\theta 1}$ (%)	$(x_\theta - \bar{x}_{\theta 1})^2$ (%)	$x_\theta - \bar{x}_{\theta 2}$ (%)	$(x_\theta - \bar{x}_{\theta 2})^2$ (%)	
2010	1011	4.85	4.75	10.00	2.11	0.28	0.08	-0.38	0.14	
	1012	6.86	6.60	26.00	3.94	2.11	4.45	1.45	2.10	
	1013	0.00	0.00	0.00	0.00	-1.83	3.35	-2.49	-	
	1014	5.82	5.64	18.00	3.19	1.36	1.85	0.7	0.49	
	1015	3.84	3.78	6.00	1.59	-0.24	0.06	-0.9	0.81	
	1021	0.00	0.00	0.00	0.00	-1.83	3.35	-2.49	-	
	1022	4.88	4.80	8.00	1.67	-0.16	0.03	-0.82	0.67	
	1023	4.90	4.80	10.00	2.08	0.25	0.06	-0.41	0.17	
	1024	4.95	4.8	15.00	3.12	1.29	1.66	0.63	0.40	
	1025	0.00	0.00	0.00	0.00	-1.83	3.35	-2.49	-	
	2011	1111	0.00	0.00	0.00	0.00	-1.83	3.35	-2.49	-
		1112	5.53	4.92	61.00	12.40	10.57	111.72	9.91	98.21
1113		5.12	4.92	20.00	4.07	2.24	5.02	1.58	2.50	
1114		3.88	3.34	54.00	16.17	14.34	205.64	13.68	187.14	
1115		0.00	0.00	0.00	0.00	-1.83	3.35	-2.49	-	
1121		0.00	0.00	0.00	0.00	-1.83	3.35	-2.49	-	
1122		5.82	5.84	-2.00	-0.34	-2.17	4.71	-2.83	8.01	
1123		4.59	4.10	49.00	11.95	10.12	102.41	9.46	89.49	
1124		6.03	5.84	19.00	3.25	1.42	2.02	0.76	0.58	
1125		4.52	4.10	42.00	10.24	8.41	70.73	7.75	60.06	
2012 年		1211	4.48	4.64	-16.00	-3.45	-5.28	27.88	-5.94	35.28
		1212	4.00	4.16	-16.00	-3.85	-5.68	32.26	-6.34	40.20
	1213	5.18	5.40	-22.00	-4.07	-5.90	34.81	-6.56	43.03	
	1214	5.89	6.20	-31.00	-5.00	-6.83	46.65	-7.49	56.10	
	1215	0.00	0.00	0.00	0.00	-1.83	3.35	-2.49	-	
	1221	0.00	0.00	0.00	0.00	-1.83	3.35	-2.49	-	
	1222	4.30	4.34	-4.00	-0.92	-2.75	7.56	-3.41	11.63	
	1223	4.00	4.05	-5.00	-1.23	-3.06	9.36	-3.72	13.84	
	1224	4.30	4.34	-4.00	-0.92	-2.75	7.56	-3.41	11.63	
	1225	4.00	4.05	-5.00	-1.23	-3.06	9.36	-3.72	13.84	

- : 无数据。

2.3 HCV-RNA 扩展不确定度计算 按公式 5 计算出扩展不确定度为 ±16.18%, 剔除上述 8 个检测为零的数据后重新计算得到 ±17.16%。

3 讨 论

测量不确定度是传统误差理论发展和完善的产物, 以参数的形式表示了无法修正的那部分误差, 取消了随机和系统误差的分类方法, 表示的是一种包括测量真值在内的一组测量结果

范围, 表征被测量值的分散性, 即与结果联系的参数, 只有提供不确定度的定量检测, 测量结果才是完整的, 据此可将检测过程分为分析前不确定度、分析中不确定度及分析后不确定度。

目前, 在临床检验实验室里, HCV-RNA 分析前不确定度影响因素涉及药物干扰、患者准备、患者生物变异、抽血技术、抽血时间、试管、抗凝剂、标本状态、运送等, 较为复杂, 因素间环环相扣, 随意性较大, 检验科往往对此类影响不可预知, 不确

定度分量的贡献难以定义,导致其数学模型不完善、不稳定,不适宜对其进行评估。而对于分析后的不确定度评估,Linko 等^[5]认为其对检验结果影响较小,其不确定分量可以忽略。分析中的影响因素也不少,实时荧光定量 PCR 法测 HCV-RNA 分析中测量不确定度主要来源有内源性 & 外源性 RNA 酶干扰、加样枪准确性、核酸提取效率、扩增反应体系及数据分析等,但影响因素较为稳定,可预知可控,可将多因素合并成总的不确定度进行评估。Magnusson 等^[6]建议在临床实验室里,可用常规室内质控及室间质评数据评估测量不确定度。

在医学检验领域,是对测量程序还是对测量结果进行测量不确定度的评估存在争议^[7-8],评估方法也各异^[9]。其评估方式主要有《测量不确定度表示指南》自下而上的 GUM 模式和 Nordtest 准则的自上而下两种方式为主。Nordtest 准则主要用总不精密度及系统偏倚来评估检测项目的测量不确定度。本研究结果显示,同一天内对 HCV-RNA 室内质控进行 12 次检测得出批内变异系数为 2.55%,对室内质控 155 d 检测结果计算出批间变异系数为 5.80%,可反映检测项目的总不精密度,无须对各不确定分量一一建立数学模型,大大简化了分析步骤;室间质评数据则主要反映较准物及系统偏倚的情况,计算其变异系数为 5.04%,但在 30 个检测数据里有 8 个检测结果为零,为零的数据表示的是 HCV-RNA 含量低于试剂盒定量检测线性范围下限,经对数转换后变为零,该份标本浓度处于方法检测下限,但各实验室所用方法的检测范围为 12~1 000 IU/mL^[10],这些检测结果虽然与预期结果相符,实际检测结果各个实验室可能有极大差别,即数据的可靠性存疑,不应该将这类数据纳入不确定度的评估。最终计算出荧光定量 PCR 法 HCV-RNA 扩展不确定度为 ±16.18%,剔除 8 个检测结果为零的数据后 HCV-RNA 扩展不确定度为 ±17.16%,可以看出,对不合格检验数据的纳入会人为减小测量不确定度,所以检测数据的纳入时应考虑检测方法的特殊性。

从本文数据获得过程看,评估方式简单,数据获取容易,无须额外进行检测,成本较低。一般三级甲等医院开展的检测项

目在 400~1 000 项不等,若按 GUM 模式进行检测项目的测量不确定度评价,步骤繁琐,工作量相当大,只存在理论上完成的可能,各实验室应在 ISO15189 框架下积极探索适合自己实验室的测量不确定度评估方式。

参考文献

- [1] 中国合格评定国家认可委员. CNAS-CL07 测量不确定度要求[S]. 2 版,北京:中国计量出版社,2011.
 - [2] 中国合格评定国家认可委员. CNAS-GL05 测量不确定度要求的实施指南[S]. 北京:中国计量出版社,2011.
 - [3] Bertil M, Havard H, Mikael K, et al. Nordtest handbook for calculation of measurement uncertainty based on quality control and method validation[M]. Espoo, Finland: Nordtest, 2003.
 - [4] 王治国. 临床检验质量控制技术[M]. 2 版. 北京:人民卫生出版社,2008:432-435.
 - [5] Linko S, Ornamark U, Kessel R, et al. Evaluation of uncertainty of measurement in routine clinical chemistry-applications to determination of the substance concentration of calcium and glucose in serum[J]. Clin Chem Lab Med, 2002, 40(4): 391-398.
 - [6] Magnusson B, Ossowicki H, Rienitz O, et al. Routine internal and external-quality control data in clinical laboratories for estimating measurement and diagnostic uncertainty using GUM principles[J]. Scand J Clin Lab Invest, 2012, 72(3): 212-220.
 - [7] 王惠民, 季伙燕. 医学检验中应该评定“测量程序”还是“测量结果”的不确定度[J]. 临床检验杂志, 2011, 29(5): 324-326.
 - [8] 黄永富, 许文荣, 曹兴建. 全自动生化分析仪检测系统过程能力与不确定度的研究[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(7): 650-652.
 - [9] 朱红梅, 吴美辉, 罗丹, 等. 临床生化检验测量不确定度的评估[J]. 检验医学与临床, 2012, 9(8): 922-923.
 - [10] 杨瑞峰, 魏来. 丙型肝炎病毒感染的检测[J]. 临床肝胆杂志, 2011, 27(1): 1-7.
- (收稿日期:2012-11-08)
-
- (上接第 1562 页)
- [13] Giannitsis E, Kurz K, Hallermayer K, et al. Analytical validation of a high-sensitivity cardiac troponin T assay[J]. Clin Chem, 2010, 56(2): 254-261.
 - [14] Apple FS. A new season for cardiac troponin assays: it's time to keep a scorecard[J]. Clin Chem, 2009, 55(7): 1303-1306.
 - [15] 潘柏申. 迎接高敏感方法检测心肌肌钙蛋白时代的到来[J]. 中华检验医学杂志, 2010, 33(9): 805-808.
 - [16] Hamm CW, Bassand JP, Agewall S, et al. ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute coronary syndromes (ACS) in patients presenting without persistent ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC)[J]. Eur Heart J, 2011, 32(23): 2999-3054.
 - [17] 吴炯, 宋凌燕, 张春燕, 等. 高敏感心肌肌钙蛋白 T 检测方法在诊断急性心肌梗死中的价值[J]. 中华检验医学杂志, 2010, 33(9): 825-830.
 - [18] Reichlin T, Schindler C, Drexler B, et al. One-hour rule-out and rule-in of acute myocardial infarction using high-sensitivity cardiac troponin T[J]. Arch Intern Med, 2012, 172(16): 1211-1218.
 - [19] Haaf P, Drexler B, Reichlin T, et al. High-sensitivity cardiac troponin in the distinction of acute myocardial infarction from acute cardiac noncoronary artery disease[J]. Circulation, 2012, 126(1): 31-40.
 - [20] Falkensammer J, Gasteiger S, Stojakovic T, et al. Elevated baseline hs-cTnT levels predict exercise-induced myocardial ischemia in patients with peripheral arterial disease[J]. Clin Chim Acta, 2012, 413(19/20): 1678-1682.
 - [21] Mingels A, Jacobs L, Michielsen E, et al. Reference population and marathon runner sera assessed by highly sensitive cardiac troponin T and commercial cardiac troponin T and I assays[J]. Clin Chem, 2009, 55(1): 101-108.
 - [22] Palladini G, Barassi A, Klersy C, et al. The combination of high-sensitivity cardiac troponin T (hs-cTnT) at presentation and changes in N-terminal natriuretic peptide type B (NT-proBNP) after chemotherapy best predicts survival in AL amyloidosis[J]. Blood, 2010, 116(18): 3426-3430.
 - [23] Okura H, Suzuki R, Sugibayashi S, et al. Performance and clinical utility of a high-sensitivity troponin T assay[J]. Rinsho Byori, 2012, 60(5): 407-413.
 - [24] 邓永超, 莫丽亚, 唐喜春, 等. 血清心肌肌钙蛋白 I 与超敏 C 反应蛋白检测在婴幼儿重症肺炎中的诊断价值[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(3): 288-289.
 - [25] Tousoulis D, Kampoli AM, Stefanadi E, et al. New biochemical markers in acute coronary syndromes[J]. Curr Med Chem, 2008, 15(13): 1288-1296.
- (收稿日期:2013-01-12)