

• 质控与标规 •

参与胱抑素 C 国家候选标准物质联合定值的评定研究

梁海港, 陈明, 麦颖军, 王磊, 王英国[△], 蔡锦刚, 康娟, 余枝广

(1. 深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司, 广东深圳 518057; 2. 北京市医疗器械检验所, 北京 100010)

摘要:目的 作为合作定值单位, 用国际公认的参考物质进行胱抑素 C 国家候选标准物质的定值, 协助北京市医疗器械检验所完成胱抑素 C 国家标准物质认证工作。方法 根据国际参考物质 ERM-DA471 报告提供的靶值和定值程序, 用该参考物质校准 Hitachi 7180 生化分析系统, 测试经过 6 点稀释的国家候选标准物质。结果 在定值结果重复性和互通性等良好的前提下, 迈瑞定值结果作为有效结果参与标物靶值计算, 成功协助北京市医疗器械检验所通过申请并获得了胱抑素 C 国家标准物质证书。结论 定值结果与其他参与单位比对良好, 并且内部评估无明显基质效应。

关键词: 国家候选标准物质; 参考物质; 互通性; 基质效应

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.18.042

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)18-2521-02

Participating in the evaluation of combined value assignment of Cystatin-C as a national standard material candidate

Liang Haigang, Chen Ming, Mai Yingjun, Wang Lei, Wang Yingguo[△], Cai Jingang, Kang Juan, Yu Zhiguang

(1. Shenzhen Mindray Bio-medical Electronics Co., Ltd, Shenzhen, Guangdong 518057, China;

2. Beijing Institute of Medical Device Testing, Beijing 100010, China)

Abstract: Objective As a collaborator of Beijing Institute of Medical Device Testing for value assignment of state standard material candidate Cystatin-C, we have used the internationally accepted reference material to assign value for state standard material candidate Cystatin-C, and help Beijing Institute of Medical Device Testing get Cystatin-C national standard material certificate.

Methods According to the target value and operational procedure of international reference material ERM-DA471, We have tested 6 dilutions of standard material candidate Cystatin-C on calibrated Hitachi 7180 immunoassay system. **Results** The results demonstrate good repeatability and commutability, and have been accepted in calculating the final value for the candidate standard material, our data has assisted Beijing Institute of Medical Device Testing in passing the criteria and obtaining Cystatin-C national standard material certificate. **Conclusion** Compared to the data from all participating collaborators, our results hit right on the target value, and no significant matrix effects have been observed.

Key words: national standard material candidate; reference material; commutability; matrix effects

胱抑素 C(CysC)是一种非糖化的蛋白,是半胱氨酸蛋白酶抑制剂的一种^[1]。CysC 由有核细胞以一种恒定的方式产生, CysC 较血清 BUN、Cr 具有更高的灵敏度和特异性,对于评价肾小球滤过率有非常重要的价值^[2]。本研究通过参与 CysC 国家候选标准物质定值,协助北京市医疗器械检验所获得其国家标准物质证书,有助于该项目国内临床标准化。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂 Hitachi 7180 生化分析系统, Mettler Toledo 精密电子天平, Eppendorf Reference 移液器, Fluke 1521 精密测温仪, ERM-DA471 参考物质(用于定标, 简称为 R, 2 支), 国家候选标准物质(作为待测样本, 简称为 T, 2 支), DAKO 免疫生化检测试剂盒, 稀释缓冲液(含 154 mmol/L NaCl, 4% BSA, 15 mmol/L NaN₃), 超纯水。

1.2 方法^[3-7] (1)参考物质的准备:在测试前一天下午,严格按照 ERM-DA471 使用说明书上注明的复溶程序将其冻干粉复溶。(2)将 ERM-DA471 原液浓度设为 1, 手动稀释, 得到 6 个浓度梯度的稀释样本(注意每步稀释都需用天平称重, 最终的稀释比通过质量来确定。以下所有涉及到稀释过程的情况均相同), 以参考物质的稀释系列为定标液进行定标, 通过适当的曲线拟合模型(如 Spline 等)得到吸光度相对于浓度的校准曲线。(3)对国家候选标准物质进行系列稀释, 共稀释 6 个浓度梯度, 对每个稀释系列进行双份平行测定, 得出各个稀释样

本的相对浓度(以 ERM-DA471 的浓度百分数表示), 同时以 ERM-DA471 的 1 个稀释系列作为质控进行测试。(4)上述实验重复两天, 每天进行 3 个循环, 共计 6 批实验数据。实验完成后, 打印实验参数、校准曲线和实验结果。(5)用 Origin 6.0 数据统计软件进行处理, 以国家候选标准物质的稀释比为横坐标, 各稀释比对应的相对浓度为纵坐标, 线性回归, 斜率 $k = C'(T)/C'(R)$, $C'(T)$ 为国家候选标准物质的质量浓度, $C'(R)$ 为 ERM-DA471 的质量浓度。(6)将 $C'(T)/C'(R)$ 的分子和分母分别乘以 $\rho(T)$ 和 $\rho(R)$ 最终得到 $C(T)/C(R)$ (其中 $C(R)$ 、 $C(T)$ 均为体积浓度), 即 $C(T)/C(R) = k \times \rho(T)/\rho(R)$ 。通过实验验证, 国家候选标准物质的密度 $\rho(T)$ 和 ERM-DA471 的密度 $\rho(R)$ 很接近, 因此, 公式简化为 $C(T)/C(R) = k$, 已知 $C(R)$, 可求出 $C(T)$ 。

2 结 果

2.1 接受标准 每一组数据质控平均结果与质控计算值比值在 1.00 ± 0.05 范围内; 以国家候选标准物质的稀释比和各稀释比对应的相对浓度, 做最小平方和线性回归分析, 得到的回归方程 $Y = kX + b$ 及统计分析结果, $r > 0.98$; 若截距满足 $|b| - 4s < 0.01$, 认为该国家候选标准物质无明显基质效应; 参与线性回归的每组数据至少保证四个点有效^[8-10]。

2.2 如法处理的数据 测试结果和定值结果见表 1。线性拟合, 斜率为 0.774 8, 截距为 0.014 6, 相关系数为 0.999 1, 定值

结果为 4.25 mg/L。

表 1 CysC 国家候选标准物质实验结果

| 项目 | T1 | T2 | T3 | T4 | T5 | T6 | C |
|---------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 第 1 天 | | | | | | | |
| 循环 1 | 76.950 | 63.050 | 47.900 | 32.250 | 15.750 | 10.300 | 51.250 |
| 循环 2 | 77.050 | 63.200 | 48.600 | 32.200 | 15.650 | 10.300 | 51.500 |
| 循环 3 | 78.450 | 64.000 | 48.250 | 32.550 | 16.300 | 10.300 | 51.700 |
| 平均(Y,%) | 77.483 | 63.417 | 48.250 | 32.333 | 15.900 | 10.300 | 51.483 |
| 质控预期浓度 | — | — | — | — | — | — | 51.570 |
| 质控比值(测试值/计算值) | — | — | — | — | — | — | 0.9983 |
| 第 2 天 | | | | | | | |
| 循环 1 | 78.800 | 64.200 | 47.800 | 32.350 | 16.050 | 10.400 | 48.400 |
| 循环 2 | 80.200 | 64.750 | 47.600 | 32.100 | 15.650 | 10.400 | 48.800 |
| 循环 3 | 79.500 | 65.250 | 47.800 | 32.150 | 15.600 | 10.400 | 48.800 |
| 平均(Y,%) | 79.500 | 64.733 | 47.733 | 32.200 | 15.767 | 10.400 | 48.667 |
| 质控预期浓度 | — | — | — | — | — | — | 49.610 |
| 质控比值(测试值/计算值) | — | — | — | — | — | — | 0.9809 |

T_i(i=1,2...6);CysC 国家候选标准物质稀释系列;C:质控;—:无数据。

2.3 定值结果不确定度评定 由公式 C(T)=k×C(R)可知,

$$\left\{ \frac{u[C(T)]}{C(T)} \right\}^2 = \left[\frac{u(k)}{k} \right]^2 + \left\{ \frac{u[C(R)]}{C(R)} \right\}^2 \quad (1)$$

式,其中 u[C(T)]为 CysC 国家候选标准物质定值的不确定度, u(k)为回归直线斜率 k 的不确定度, u[C(R)]为国际参考物质 ERM-DA471 的不确定度,说明书中已经给出,已知 u(k),即可计算出 u[C(T)]。回归直线斜率 k 的不确定度可以通过以下方法进行计算:对于回归直线 Y=kX+b,由最小二乘法可知, $k = \frac{L_{xy}}{L_{xx}}$,其中 $L_{xx} = \sum (x_i - \bar{x})^2$, $L_{xy} = \sum (x_i - \bar{x}) y_i$ 。根据方差的性质有: $D(k) = D\left(\frac{L_{xy}}{L_{xx}}\right) = \frac{1}{L_{xx}^2 \sum (x_i - \bar{x})^2} D(y_i)$,其中 D(k)为斜率 k 的方差, D(y_i)为 y 的方差,由上式可得(2)式: $u(k) = u(y) \sqrt{\frac{1}{L_{xx}}}$, (3)式: $u(y) = \sqrt{\frac{\sum (y_i - kx_i - b)^2}{n-t}}$,其中 t 取 2, n 为数据组的个数。通过公式(1)(2)(3)可求出 CysC 国家候选标准物质的不确定度,计算得到的不确定度,见表 2。

表 2 CysC 国家候选标准物质定值结果不确定度

| 不确定度类型 | 计算值 |
|-----------------------------|---------|
| u(k) | 0.482 7 |
| u[C(R)] | 1.368 6 |
| 合成相对不确定度 u[C(T)] | 1.451 2 |
| 合成标准不确定度 u[C(T)] | 0.061 7 |
| 扩展不确定度 U _c (k=2) | 0.123 4 |

3 讨 论

CysC 国家候选标准物质的定值是在多家单位的联合参与下共同完成的,本单位作为其中的一家参与并进行了该实验。在保证操作人员、仪器、试剂等条件完全一致前提下,严格按照操作规程开展实验,2 d 定值结果的重复性比较理想,且满足 |b| - 4s < 0.01 的要求,并由斜率 k 结合 ERM-DA471 标称浓度计算出该国家候选标准物质的定值结果。

定值实验结束后,对 CysC 国家候选标准物质的互通性进行了评估,评估程序依据 EP-14A 文件进行,最终的实验结果表明该物质和临床血清样本相比,并无明显基质效应的存在。

本单位研究结果协助北京市医疗器械检验所通过申请并获得了国家质量监督检验检疫总局颁发的 CysC 国家标准物质证书,在很大意义上,对国内临床胱抑素 C 项目的一致性、标准化起到了铺垫作用。

志谢:感谢北京市医疗器械检验所专家的支持与指导。

参考文献

- [1] 蔡钢强, 垢敬, 焦连亨. 胱抑素 C 的生物学特性及临床应用评价[J]. 国际检验医学杂志, 2006, 27(5): 457-460.
- [2] 向礼贤. 血清胱抑素 C 检测与疾病[J]. 四川医学, 2004, 25(11): 1258-1259.
- [3] 余洪立. 血清胱抑素 C 测定的方法学研究进展[J]. 广西医学, 2004, 26(3): 366-368.
- [4] 刘庆, 邵志新. 回归分析的直线拟合不确定度探讨[J]. 中国测试, 2009, 35(3): 41-44.
- [5] 苏增留, 张克坚. 基质效应与准确度评价[J]. 齐鲁医学检验, 2000, 11(3): 9-12.
- [6] 张才成, 陈静, 万腊根. 回收试验与基质效应评价[J]. 实验与检验医学, 2011, 29(3): 269-270.
- [7] 王毓三. 基质效应[J]. 临床检验杂志, 2002, 20(Z1): 112-115.
- [8] Newman DJ. Cystatin C[J]. Ann Clin Biochem, 2002, 39(2): 89-104.
- [9] Blirup-Jensen S, Johnson AM, Larsen M, et al. Protein standardization V: value transfer. A practical protocol for the assignment of serum protein values from a Reference Material to a Target Material[J]. Clin Chem Lab Med, 2008, 46(10): 1470-1479.
- [10] Clinical and Laboratory Standards Institute. EP14-A2 Evaluation of matrix effects[S]. Wayne, PA, USA: CLSI, 2008.

(收稿日期: 2014-05-16)