• 论 著 •

红细胞沉降率标准物质均匀性和稳定性评价

孙荣荣, 眭国平, 丁敏, 陆逊, 肖瑶, 王鹏德, 顾玮然

(上海市计量测试技术研究院, 上海 201203)

摘要:目的 对红细胞沉降率(ESR)标准物质的均匀性和稳定性进行评价。方法 根据国际化标准组织 GUIDE 35《标准物质定值的通用原则及统计学原理》对制备完成的标准物质随机抽取足够的样品,采用方差分析法进行均匀性评价,用线性趋势模型评价标准物质的稳定性。结果 均匀性评价结果表明样品组内和组间方差差异无统计学意义($P>0.05$);稳定性数据分析结果显示,标准物质 ESR 随存储时间的线性变化趋势稳定,差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 制备的 ESR 标准物质均匀性、稳定性符合国家二级标准物质的要求。

关键词:红细胞沉降率; 标准物质; 均匀性; 稳定性

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.11.023

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)11-1535-03

Homogeneity and stability analysis for reference material of erythrocyte sedimentation rate

Sun Rongrong, Sui Guoping, Ding Min, Lu Xun, Xiao Yao, Wang Pengde, Gu Weiran

(Shanghai Institute of Measurement and Testing Technology, Shanghai 201203, China)

Abstract: Objective To evaluate the homogeneity and stability analysis for reference material of erythrocyte sedimentation rate (ESR). Methods After the reference material was prepared, enough samples were extracted randomly according to ISO guide "35 Reference materials-General and statistical principles for certification", variance analysis method was used to estimate the homogeneity, and linear trend model was used to estimate its stability. Results The variance within group and variance between group had no significant differences statistically ($P>0.05$). The linear change trend of the ESR value of reference material with storage time was not statistically significant ($P>0.05$). Conclusion The homogeneity and stability of ESR reference material accords with the criterion of national second-level reference materials.

Key words: erythrocyte sedimentation rate; reference material; homogeneity; stability

红细胞沉降率(ESR)是指在一定条件下,离体抗凝血在静置过程中红细胞自然下沉的速率^[1]。一般用 1 h 内红细胞下沉的高度表示,单位为 mm/h,可溯源至国际 SI 单位制。ESR 是目前临床的常规检测指标,应用广泛。在组织开展全国 ESR 检测间质量评价活动的过程中,质控物的提供主要依赖于国外生产商生产的质控物,其存在价格昂贵、购买周期长、入关困难、中间环节繁琐等问题,给各临床实验室和间质量评价组织机构的应用带来较大困难^[2]。在这样的背景下,研制了一套 3 种不同量值水平的临床 ESR 标准物质 RM₁、RM₂、RM₃,为 ESR 检测方法评定提供依据,保证 ESR 测量结果在时间和空间上的准确性和可比性,从而保证 ESR 实现有效溯源,填补国内空白,并申请到国家二级标准物质。本文根据国际化标准组织(ISO)《标准物质定值的通用原则及统计学原理》^[3],对 ESR 标准物质进行均匀性和稳定性评价。

1 材料与方法

1.1 材料 类人类血原料替代人类血液作为临床 ESR 标准物质的原料。

1.2 方法 通过细胞提取分离、保养、细胞固化等加工技术,模仿全血中纤维蛋白原和 α_1 、 α_2 球蛋白作用,分析影响 ESR 标准物质的多种因素,最终确定其制备工艺,将标准物质均匀分装至血清小瓶,每瓶 2 mL,按分装顺序编号,然后置 2~8 °C 冰箱存放,对其进行均匀性和稳定性检验,由 8 家实验室包括医院临床检验实验室采用国际血液学标准委员会(ICSH)ESR 检测参考方法——魏氏手工法协同定值^[4-7]。

1.3 均匀性评估 按照 ISO GUIDE 35 均匀性检验要求,用方差分析法对该套标准物质进行均匀性评价,方差分析方法是用来统计检验均匀性的最常用方法,是通过组间方差和组内方差的比较来判断各组测量值之间有无系统性差异,如果两者的差异小于统计检验的临界值,则认为样品是均匀的^[8-9]。对每瓶只能单次取样的样品其具体方法为:随机抽取 m 瓶样品混合在一起,从中取样对其测量 m 次得 x_i ,计算组内方差和,另随机抽取 n 瓶样品,对每瓶测量一次得 y_i ,计算组间方差和,因每瓶 ESR 标准物质只能手工法测量一次,因此对 3 批量值水平的 ESR 标准物质(RM₁、RM₂、RM₃)分别随机抽取 10 瓶混合计算组内方差,随机抽取 15 瓶计算组间方差,其中 $m=10$, $n=15$ 。如果测定方差差异无统计学意义,则应满足以下公式的统计要求: $F = \frac{s_1^2}{s_2^2} \leq F_\alpha(v_1, v_2)$,其中 $s_1^2 = \frac{Q_1}{v_1}$; $s_2^2 = \frac{Q_2}{v_2}$ 。其中组间方差和计算公式为: $Q_1 = \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2$;组内方差和计算公式为: $Q_2 = \sum_{i=1}^m (x_i - \bar{x})^2$,组间自由度(v_1)= $n-1$,组内自由度(v_2)= $m-1$ 。

1.4 稳定性评估 稳定是生物类标准物质研制的关键环节,保持样品稳定性的措施必须贯穿标准物质研制的全过程。标准物质的稳定性是被测特性随时间变化的描述,包括物质的物理化学性质。影响稳定性因素很多,除标准物质自身性质外,包括标准物质加工制备过程、标准物质制备存储容器、外部存储条件等。综合研究以上各条件后,确定了标准物质的最终包

装及存储方式,并对其稳定性进行检验^[10-11]。由于标准物质在使用过程中不可避免受运输等因素影响,因此对本套标准物质分别进行了短期稳定性考察与长期稳定性考察。

1.4.1 短期稳定性 短期稳定性考察采用同步稳定性研究,即使所有稳定性研究的测量能在重复性条件下进行,一次测量做一次校准。试验模拟样品在运输中可能遇到的条件,将制备的 3 个量值水平的标准物质(RM₁、RM₂、RM₃)各取 12 瓶,各分为 4 组,每组 3 袋,分别放置在 -20 ℃、4 ℃、室温 20~24 ℃ 和 40 ℃ 条件下保存 2 周后同时进行测试考察短期稳定性,以 *t* 检验法对该套标准物质的短期稳定性进行评价。根据统计学理论,标准值 $\bar{x}$ 的随机不确定度应为 $\pm t_{(\alpha, n-1)}s$,当各个监测温度下两周后的监测值与总平均值(均匀性检验时的平均值)的极差小于平均值的随机不确定度时则可以认为该标准物质在监测时间段内没有明显变化。 $|x_i - \bar{x}| \leq t_{(\alpha, n-1)} \cdot s$,即 $\frac{|x_i - \bar{x}|}{s} < t_{(\alpha, n-1)}$,式中 x_i 为第 *i* 次测定值,mm/h; $\bar{x}$ 为 *n* 次测定值的算术平均值,mm/h;*s* 为测量方法的标准偏差,mm/h; $t_{(\alpha, n-1)}$ 为检验水准 α ,自由度 *n*-1 时的 *t* 检验临界值。

1.4.2 长期稳定性 长期稳定性考察采用经典稳定性研究,即同时制备的样品在相同条件下随着时间的推移进行测量。由于没有物理或化学模型能够真实地描述 ESR 的沉降机制,故可选用线性模型作为该标准物质的经验模型。实际上对此模型中的特性量值 ESR,人们期望直线的截距(在不确定度范围内)等于该标准物质的定值结果;同时,直线的斜率趋近于零。分别在样品制备完成后当天、1、2、3、5、7、10、14、19、26 周对制备的 ESR 标准物质(RM₁、RM₂、RM₃)进行长达半年的长期稳定性考察,时间间隔先密后疏,跟踪 ESR 值随时间的变

化,在每个时间点对每组量值水平 ESR 标准物质随机抽取 3 瓶,利用 ICSH 参考法每个样品重复测定 1 次,每次检验条件一致。选用线性模型对 RM₂ 的稳定性进行评价,其直线斜率

$$b_1 = \frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})}{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}$$

可用以下公式计算:截距可由以下

公式计算: $b_0 = \bar{Y} - b_1 \bar{X}$ 。直线上每点的标准偏差可用以下公式计算:

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (Y_i - b_0 - b_1 X_i)^2}{n - 2}$$

与斜率相关的不确定度为: $s(b_1) =$

$$\frac{s}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}}$$

。在自由度为 $n - 2 = 8$ 时,置信水平 $P = 0.95$ 情况下, $|b_1| < t_{0.05, 8} \cdot S(b_1)$ 。

2 结 果

2.1 均匀性评估 以 RM₂ 为例,当检验水准 $\alpha = 0.05$ 时 $F = 1.88, F_{0.05}(14, 9) = 3.03$,RM₂ 符合 ISO GUIDE 35 均匀检验合格要求,对 RM₁ 和 RM₃,*F* 均小于 $F_{0.05}(14, 9)$ 得到同样的结果,证明该套临床 ESR 标准物质是均匀的。

2.2 稳定性评估

2.2.1 短期稳定性评估结果 ESR 标准物质在运输条件 -20 ℃ 和 40 ℃ 下 14 d 内是不稳定的,在 4 ℃ 和常温下,在 95% 置信水平上,短期稳定性考察结果与均匀性实验结果之间比较差异无统计学意义($P > 0.05$),满足实际运输要求。见表 1。

表 1 临床 ESR 标准物质短期稳定性检验结果

临床 ESR 标准物质	-20 ℃ (mm/h)	4 ℃				常温(20~24 ℃)				40 ℃ (mm/h)
		检测结果 (mm/h)	平均值(mm/h)	检测结果 (mm/h)	均值(mm/h)	检测结果 (mm/h)	均值(mm/h)	检测结果 (mm/h)		
RM ₁	变质	10.2	9.6	9.6	9.8	10.5	12.4	11.0	11.3	变质
RM ₂	变质	64.2	61.5	61.2	62.3	65.1	62.2	64.1	63.8	变质
RM ₃	变质	120.8	123.9	122.8	122.5	122.2	125.7	122.9	123.6	变质

2.2.2 长期稳定性评估结果 ESR 标准物质 RM₁、RM₂ 和 RM₃ 在规定时间内无明显的上升或下降趋势,且变化范围均在特性量值及其不确定度范围内,因此,在 4 ℃ 条件下保存,可以判定在 6 个月内是稳定的。线性模型对临床 ESR 标准物质的稳定性进行评估,见表 2。

表 2 临床 ESR 标准物质在 4 ℃ 条件下的稳定性评价结果

项目	RM ₁	RM ₂	RM ₃
斜率	-0.083 3	-0.012 3	-0.036 5
截距	10.595 0	61.307 0	120.218 0
	0.085 8	0.120 0	0.147 0
	0.198 0	0.276 0	0.340 0
结论	稳定	稳定	稳定

3 讨 论

以应用比较广泛的 ESR 检验参数为突破口,研制 ESR 标

准物质,顺应国内对临床检验标准物质的迫切需求,建立 ESR 量值溯源体系和临床检验参考系统,保证 ESR 测量结果的准确性和可比性,切实保护患者权益和生命安全,并为其他临床医学标准物质的研制奠定基础。

按照 ISO Guide 35 标准文件要求,制备的 ESR 标准物质首先要进行均匀性检验,均匀性检验合格后,在规定的保存条件下再做稳定性评价。均匀性评价中,由于 ESR 标准物质最小分装量为每支 2 mL,只能手工法测量一次,因此对三批量值水平的 ESR 标准物质(RM₁、RM₂、RM₃)分别随机抽取 10 瓶混匀计算组内方差。均匀性评价结果显示,样品内与样品间的方差无统计学意义($P > 0.05$),表明所制备的 ESR 标准物质是均匀的。

由于新版 ISO Guide35 中增加了稳定性研究数据分析及不确定度计算的相关内容,故应当尽可能在重复性条件下进行测量,以稳定性的不确定度来评估标准物质的有效期。本实验依据最新的 ISO Guide 35,对 ESR 标准物质(下转第 1539 页)

特异度为 90.5%，对其他消化道癌的灵敏度不高，与相关文献报道基本一致^[1]。

CEA 是一种酸性糖蛋白，对由内胚层分化来的肿瘤，特别是消化道腺癌具有较高的阳性检出率，尤其对结肠癌有较高诊断价值^[2]。血清中 CEA 浓度逐渐增高或保持较高水平，则有罹患恶性肿瘤可能。有文献报道 CEA 在胃癌患者血清中的灵敏度为 13%~35%，CEA 水平高低与肿瘤大小、淋巴结或其他部位转移预后有关^[3]。本研究结果显示 CEA 对消化道恶性肿瘤的灵敏度由高到低依次为结肠癌、胰腺癌、胃癌、肝癌。

CA19-9 是消化系统肿瘤分泌的低聚糖肿瘤相关抗原，在胰腺癌、胆囊癌及结肠癌中具有较高的阳性率^[4]。相关文献报道肝癌患者 CA19-9 阳性检出率为 56.0%~60.2%，特别是在 AFP 阴性患者中，CA19-9 阳性检出率较高。恶性肿瘤治疗中及手术后检测 CA19-9 对疗效评定有重要意义，一般 CA19-9 升高可作为肿瘤复发转移亚临床诊断的重要辅助诊断指标^[5]。本研究中 CA19-9 对消化道恶性肿瘤灵敏度由高到低依次为胰腺癌 53.1%、肝癌 48.2%、结肠癌 40.0%、胃癌 39.7%，对胰腺癌的诊断灵敏度最高。

CA72-4 属于黏蛋白类癌胚抗原，存在于 50% 的乳腺组织和 85%~95% 的结肠、胰腺、胃、肺及卵巢的肿瘤中，是检测胃癌和各种消化道癌症的标记物，对胃癌灵敏度较高，对胰腺癌、结肠癌等也有一定的灵敏度。有文献报道，CA72-4 临床诊断胃癌灵敏度为 59%~94%^[6]。本研究中胃癌 CA72-4 灵敏度为 54.0%，结肠癌 CA72-4 灵敏度为 17.1%，对肝癌、胰腺癌的灵敏度较低。

单一肿瘤标志物的灵敏度及特异度有相对局限性，容易造成漏检，而多项肿瘤标志物联合检测则可提高肿瘤检出的灵敏度^[7-8]，但联合数量的增加又会降低对肿瘤诊断的特异度。本研究结果显示，AFP 对肝癌最敏感，CEA 对结肠癌诊断较为敏感，CA19-9 对胰腺癌较敏感，CA72-4 对胃癌诊断敏感。本研究结果显示，联合检测可提高阳性率。联合检测 CEA、CA19-9、CA72-4 可使胃癌的检出阳性率提高至 76.2%，结肠癌阳性

率提高至 82.9%。联合检测 AFP、CEA、CA19-9 可使肝癌的检出阳性率提高至 78.6%，胰腺癌阳性率提高至 65.6%。本研究对比了 AFP、CEA、CA19-9、CA72-4 的不同组合联合检测对消化道肿瘤检出阳性率的影响，结果发现对于肝癌和胰腺癌的诊断，以 AFP、CEA、CA19-9 联合检测最佳；对于胃癌和结肠癌的诊断，以 CEA、CA19-9、CA72-4 联合检测最佳。因而对消化道肿瘤，应根据不同的部位采取不同项目的联合检测，既可提高阳性率又可减轻患者医疗费用，为疾病的诊断提供有价值的临床依据。

参考文献

[1] 何浩名, 韦振元, 周彦. 现代肝病的实验诊断[M]. 合肥: 安徽大学出版社, 2003: 136.
 [2] 郭琳, 陈建青, 李洁星. 结直肠癌患者 CEA, CA199, CA 242 的检测及临床意义[J]. 医学临床研究, 2010, 27(6): 1119.
 [3] 王轶. 胃癌病程分期与血清 CA724、CA242 及 CEA 水平关系探讨[J]. 放射免疫学杂志, 2006, 19(3): 225-226.
 [4] Juntermanns B, Radunz S, Heuer M, et al. Tumor markers as a diagnostic key for hilar cholangiocarcinoma[J]. Eur J Med Res, 2010, 15(8): 357-361.
 [5] 何浩明. 现代检验医学与临床[M]. 上海: 同济大学出版社, 2001: 275-278.
 [6] 李春英, 邹金海, 郑国启, 等. 胃癌患者联合检测血清 CA724、CEA、CA199 的临床价值[J]. 现代中西医结合杂志, 2012, 21(2): 157-158.
 [7] 中华医学会消化病学分会. 中国结直肠癌肿瘤筛查, 早诊早治和综合预防共识意见(一)[J]. 中华消化杂志, 2012, 32(1): 1-10.
 [8] 高志海, 田志军, 安焱. 五种肿瘤标志物联合检测在胃和结直肠癌诊断及随访中的临床意义[J]. 医学综述, 2012, 18(10): 1595-1597.

(收稿日期: 2015-02-15)

(上接第 1536 页)

的稳定性数据进行一元线性回归分析, 线性模型分析结果表明该标准物质的 ESR 值并不随存放时间的变化存在线性趋势, 显示标准物质在 2~8℃ 冷藏放置半年内是稳定的。

从上述均匀性、稳定性评价结果得出, 该 ESR 标准物质的均匀性、稳定性合乎要求, 可应用于临床检验实验室 ESR 仪的检定、校准, 应用于临床检验质量比对、实验室评价等。

参考文献

[1] 刘广宣, 张建, 胡玫, 等. 不同方法检测红细胞沉降率结果比较分析[J]. 吉林医学, 2014, 35(8): 1670-1672.
 [2] 王润琴, 李美英, 李晓斌. 三种红细胞沉降率检验方法对比分析[J]. 山西职工医学院学报, 2014, 4(4): 33-35.
 [3] International Organization for Standardization. GUIDE 35-2006 Reference materials-General and statistical principles for certification(3th edition)[S]. Switzerland: Peter Long, 2006.
 [4] International Council for Standardization in Hematology. Recommendations for measurement of erythrocyte sedimentation rate

[J]. Clin pathol, 1993, 46(1): 198-203.

[5] Anon. ICSH guidelines on selection of laboratory tests for monitoring the acute phase response[J]. Clin pathol, 1988, 41(3): 1203-1208.
 [6] 赵天军. 魏氏血液沉降率在临床应用中的误区[J]. 中国医药指南, 2013, 11(2): 131-132.
 [7] 彭金玲, 王刚. 血沉标本放置时间影响结果的实验分析[J]. 医疗装备, 2014, 27(4): 35.
 [8] 卢晓华, 李红梅. 标准物质使用中的常见问题解答[J]. 中国计量, 2013, 6(6): 32-34.
 [9] 张民. 浅谈标准物质的期间核查[J]. 计量与测试技术, 2014, 41(4): 100-101.
 [10] 王巧云, 何欣, 王锐. 国内外标准物质发展现状[J]. 化学试剂, 2014, 36(4): 289-296.
 [11] 蔡大川. 浅谈我国标准物质发展趋势[J]. 中国计量, 2014, 2(2): 79-80.

(收稿日期: 2015-02-15)