

流式细胞术检测 P 选择素的方法学性能评价

黄 山¹, 令狐颖¹, 许 健¹, 刘志琴², 袁 军² (1. 贵州省临床检验中心, 贵阳 550002; 2. 贵州省人民医院, 贵阳 550002)

【摘要】目的 对流式细胞术(FCM)检测 P 选择素进行方法学性能评价。**方法** 参考美国临床和实验室标准化协会(CLSI)系列文件, 结合工作实际, 设计验证方案, 对 BD Aria 流式细胞仪检测系统测定血浆 P 选择素的精密度、准确度、分析灵敏度、分析测量范围和生物可参考区间五大分析性能进行验证和评价, 并将实验结果与厂家(美国 BD 公司)提供的分析性能或公认的质量指标进行比较。**结果** P 选择素含量在 39.06 和 10 000 ng/L 时, 批内变异系数分别为 4.23% 和 9.00%, 批间变异系数分别为 4.63% 和 11.00%, 准确度相对偏倚分别为 2.71% 和 5.28%; 检测灵敏度为 7.88 ng/L, 分析测量范围为 7.88~103 928.00 ng/L, 生物参考区间验证为 4 512.20~10 250.00 ng/L。**结论** BD Aria 流式细胞仪检测系统检测血浆 P 选择素的分析性能符合厂家提供的性能指标和公认的质量指标。

【关键词】 流式细胞术; 方法学评价; P 选择素

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2011.07.011 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2011)07-0792-02

The evaluation of the methodology for the determination of P selectin with flow cytometry HUANG Shan¹, LING Huiying¹, XU Jian¹, LIU Zhi-qin², YUAN Jun². (1. Guizhou Province Center for Clinical Laboratory, Guizhou 550002, China; 2. Guizhou Province People's Hospital, Guiyang, Guizhou 550002, China.)

【Abstract】Objective To evaluate the performance of flow cytometry (FCM) methodology to test P-selectin. **Methods** Referring to a series of documents by the U. S. Institute of Clinical and Laboratory Standards (CLSI), as well as practical experience, we designed the plan to test and analyze the BD Aria FCM on precision, accuracy, analytical sensitivity, analytical measurement range and biological reference interval, and then compared the experiment results with the parameters provided by the manufacturer (U. S. BD company) or publicly acknowledged quality standards. **Results** When the content of P-selectin level was between 39.06 ng / L and 10 000 ng / L, the intraassay coefficient of variation was between 4.23% and 9.00%, while the interassay coefficient of variation was between 4.63% and 11.00%. The relative bias of accuracy of the two was 2.71% and 5.28% respectively. The test sensitivity was 7.88 ng / L. The domain of the analysis and measurement was 7.88—103 928.00 ng/L, while the validation of biological reference interval was 4 512.20—10 250.00 ng/L. **Conclusion** The performance of BD Aria FCM analysis system to test plasma P-selectin is in accordance with the parameters provided by the manufacturer as well as publicly acknowledged quality parameters.

【Key words】 FCM; evaluation methodology; P-selectin

P 选择素作为血小板活化的一个特征性分子标志物,一方面可早期反映冠脉综合征损伤事件(血小板活化、血栓形成、斑块不稳定)的发生,描述冠状动脉粥样硬化程度和数量的变化;另一方面,与冠状动脉病变评分呈正相关,可用于病情的预后判断。在 P 选择素的检验中,方法较多,常用的有酶联免疫吸附试验、放射免疫试验、免疫比浊等,但这些方法存在线性较窄、可比性差、干扰因素多等缺点。近年来,流式细胞分析技术(Flow Cytometer, FCM)已广泛应用于临床,并且应用前景不断扩大,为了保证患者检验结果的可靠性,对此,本研究利用美国临床和实验室标准化协会(CLSI)的有关规则,对 FCM 检测 P 选择素的方法学进行了评价,现报道如下。

1 材料与方 法

1.1 试剂与仪器 P 选择素流式检测试剂盒(批号 51-9006168, 美国 BD 公司), P 选择素标准品(批号 560426, 美国 BD 公司, 浓度 10 000 ng/L), BD Aria 流式细胞仪(美国 BD 公司)。

1.2 方法

1.2.1 仪器调试和 P 选择素标准品稀释 按照仪器操作说

明书,对 BD Aria 流式细胞仪进行仪器调试。将浓度 10 000 ng/L 的 P 选择素标准品用配套稀释液进行倍比稀释,浓度范围为 19.53~10 000 ng/L。

1.2.2 精密度验证试验^[1] 选择 P 选择素高低两个稀释浓度(10 000 ng/L 和 39.06 ng/L)标准品进行精密度试验,批内精密度的对同一样品同时重复检测 20 次,通过计算其均值和标准差得出批内变异系数。批间精密度的对每个样品每天检测 1 次,连续 20 d,通过计算其均值和标准差得出批间变异系数。

1.2.3 准确度验证试验^[1] 选择 P 选择素高低两个稀释浓度(10 000 ng/L 和 39.06 ng/L)标准品进行检测,以标准品的浓度为预期靶值,实际检测值为验证值,将验证值与预期靶值进行比对,计算验证值与靶值的相对偏倚(%),并将数据与厂家提供的性能指标或公认的质量指标进行比较。

1.2.4 灵敏度验证试验 灵敏度试验按参考文献[2-3]介绍的方法进行,以稀释液为空白样品,分别对空白样品和 P 选择素低值标准品(39.06 ng/L)进行 10 次检测,记录每次检测的荧光强度值(MFI),经过计算即得检测下限(LLD)。

1.2.5 分析测量范围试验 分析测量范围(AMR)按参考文献[2]和 CLSL EP6-A2 文件[3]方法进行,以稀释液空白代替低浓度(L),与 P 选择素高浓度(H)患者标本各一份,按 20 L、19 L+1 H、18 L+2 H、14 L+6 H、10 L+10 H、8 L+12 H、6L+14 H、4 L+16 H、2 L+18 H、20 H 的关系配制,形成系列浓度,每个标本重复测量 2 次,记录结果。将实测值与预期值作比较,确定 P 选择素的 AMR。

1.2.6 生物参考区间 参考 CLSL 的 C28-A2 文件[4],选择 50 份体检合格的健康人标本进行测定验证,观察是否需要参考区间确立实验。

2 结 果

2.1 精密度验证试验结果 对 P 选择素高低两个稀释浓度标准品进行精密度试验,批内变异系数分别为 4.23% 和 9.00%,批间变异系数分别为 4.63% 和 11.00%,均在仪器说明书范围内,也未超过免疫试验公认的质量指标[5]。

2.2 准确度验证试验结果 P 选择素两个浓度水平标准品按操作程序经过检测,以标准品的浓度为预期靶值,实际检测值为验证值,将验证值与预期靶值进行比对,其相对偏倚在 2.71%~5.28% 之间,与仪器说明书要求和免疫试验公认的质

量指标进行比较[5],均在可接受范围内。

2.3 灵敏度验证试验结果 分别对空白稀释液和 P 选择素低值标准品(39.06 ng/L)进行 10 次检测,空白稀释液和低浓度标准品的 MFI 均值分别为 47.90 和 88.90,标准差分别为 2.76 和 4.04。低浓度样品 MFI 88.90 扣除空白值 47.90 后为 41.00,按照 99.70% 的可信度,空白样本 3 倍标准差为 $2.76 \times 3 = 8.28$,因此,MFI 为 8.28 时相当于 P 选择素检测灵敏度为: $8.28/41.00 \times 39.06 = 7.88(\text{ng/L})$ 。

2.4 分析测量范围试验结果 P 选择素系列浓度标本 AMR 测定结果见表 1,采用平均斜率来确定系列标本应含有的待测物的预期值,而标本重复测定的均值为实测值。每个稀释浓度的斜率为均值减空白除以各标志物的相对加入量,将所有稀释浓度的斜率相加,算出平均斜率,各个稀释浓度的预期值等于平均斜率乘以各标志物相对加入量。以待测物预期值为 X,所有稀释浓度测定均值为实测值 Y,建立 $Y = BX + a$ 的回归方程,计算回归方程的相关系数 r,取 $r > 0.90$ 以上的范围为检测线性,得到 P 选择素的回归方程是 $Y = 1.01X + 31815.90$ 相关系数是 $r = 0.998$,AMR 的上限为 103 928.00 ng/L,结合本法的 LLD 值 7.88 ng/L,故 AMR 为 7.88~103 928.00 ng/L。

表 1 P 选择素分析测量范围结果 (ng/L)

P 选择素稀释	20L	19L	18L	14L	10L	8L+	6L+	4L+	2L+	20H
系列	—	+1H	+2H	+6H	+10H	12H	14H	16H	18H	—
稀释倍数	—	20	10	3.3	2	1.67	1.43	1.25	1.11	1
P 选择素相对加量	0	1	2	6	10	12	14	16	18	20
P 选择素实测值 1	32 005.00	35 176.00	38 350.00	50 768.00	63 726.00	70 072.00	76 415.00	85 960.00	89105.00	95450.00
实测值 2	32 142.00	35 853.00	38 965.00	51 004.00	63 856.00	70 085.00	76 520.00	86 024.00	89 285.00	95 478.00
实测均值	32 089.00	35 624.00	38 721.00	50 826.00	63 785.00	70 081.00	76 475.00	85 986.00	89 213.00	95 467.00
均数减空白	—	3 535.00	6 632.00	18 737.00	31 696.00	37 992.00	44 386.00	53 897.00	57 124.00	63 378.00
斜率	—	53.70	61.20	59.20	56.40	55.90	55.70	56.80	62.80	63.20
预期值	—	3 5752.00	3 8851.00	50 953.00	63 802.00	70 085.00	76 503.00	85 980.00	8 9276.00	95 476.00

注:—表示无数据。

2.5 生物参考区间验证结果 50 份健康人标本的血浆 P 选择素的浓度范围在 4 512.20~10 250.00 ng/L 之间,均在仪器说明书上给出的参考区间以内,可直接引用。

3 讨 论

现在,检测系统性能评估收到越来越多的医学检验界同行的认可。只有对检测系统通过正确的评估,实验室才能保证检验结果的质量。对于新采购仪器及其检测系统,在正式用于检测患者标本、发出检验报告前,实验室须对系统的操作分析性能做实验予以验证。验证实验主要包括检测系统的几大性能(精密度,准确度,患者结果可报告范围,分析灵敏度,分析特异性和参考区间等)。只有真正验证了检测系统的分析性能符合临床要求,与厂商的资料基本一致,才可以将检测系统用于常规检验。一个可靠、有效的检测系统性能评估,是建立在临床检验全面质量管理基础上的,是临床检验全面质量管理的深化和提高。同时,检测系统的分析性能评估也是医学实验室认可和“检验结果互认”的根本保证[6-7],应在有一定规模的实验室和中高档仪器的应用中进行推广,并逐渐走向常规化。

检测系统最主要的性能指标是精密度和准确度。临床化学设备或检测系统精密度的评价通常采用 CLIS EP5-A 文件,本文以 2 个稀释浓度水平标准品为实验材料,方法简便适合临

床应用,准确度采用对标准品进行检测的方式进行评估,相对偏倚在 4.72%~6.52% 之间,二者均与仪器说明书上的结果基本一致,也达到公认的质量要求[5]。对检测系统的 AMR 验证表明:该检测系统测定 P 选择素的分析灵敏度和测量范围与生产厂商给出的分析灵敏度相当。50 份健康人血浆标本检测也均在仪器说明书的参考区间以内,按照 CLSL 中 C28-A 的要求[4]可直接使用厂商提供的参考区间。

通过对流式细胞术检测 P 选择素的主要分析性能的评价,使我们充分认识到,加强检验系统的性能评估工作,对规范实验室管理,提高临床检验质量,推进检验结果互认,帮助实验室认可,具有一定的意义,应在实际工作中进行推广并应用。

参考文献

[1] 黄山,许健,邓小林. 医学实验室全面质量管理理论与实践[M]. 贵阳,贵州科技出版社,2009:67-71.
 [2] 丛玉隆,冯仁丰,陈晓东. 临床实验室管理学[M]. 北京:中国医药科技出版社,2004:96-108.
 [3] Clinical and Laboratory Standards Institute. EP6-A2, Evaluation of the linearity of quantitative analytical methods [S]. CLSI,2003:1-47. (下转第 795 页)

01)。本次研究采用病例血糖范围为 4.98~26.73 mmol/L, 两部位全血标本 POCT 血糖仪检测结果与生化分析仪检测结果比对均为负偏倚, 偏倚范围最低为 -1.5%, 最高为 -13.9%, 均未大于 20%。静脉全血血糖偏倚比指尖血血糖偏倚程度高, 两偏倚比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 见表 1。

表 1 两部位全血标本 POCT 血糖仪检测结果与生化分析仪检测结果比对 (mmol/L)

标本号	生化仪测定 血浆葡萄糖 (%)	指尖血血糖 (偏倚%)	静脉全血血糖 (偏倚%)
1	8.71	8.39(-1.6)	8.26(-5.4)
2	7.43	7.30(-1.7)	7.25(-2.4)
3	7.79	7.42(-5.0)	7.31(-6.2)
4	5.67	5.58(-1.6)	5.60(-1.2)
5	9.32	8.91(-4.4)	8.69(-6.8)
6	6.78	6.44(-4.9)	6.30(-7.1)
7	9.31	9.11(-2.1)	9.0(-2.8)
8	8.59	8.17(-4.9)	8.10(-5.7)
9	4.98	4.89(-3.6)	4.74(-4.8)
10	8.09	7.79(-3.7)	7.60(-6.1)
11	8.27	8.01(-3.1)	8.0(-3.1)
12	6.55	6.15(-6.1)	6.01(-8.2)
13	8.64	8.35(-3.3)	8.19(-5.2)
14	7.72	7.43(-3.8)	7.25(-6.1)
15	12.70	11.60(-9.4)	11.14(-12.3)
16	8.65	8.34(-3.6)	8.10(-6.4)
17	10.74	10.03(-6.6)	9.80(-8.7)
18	17.43	16.01(-8.1)	15.0(-13.9)
19	9.85	9.70(-1.5)	9.57(-3.3)
20	6.67	6.35(-4.8)	6.27(-3.3)
21	19.07	17.01(-10.7)	16.41(-13.9)
22	26.73	24.03(-10.2)	23.30(-12.8)

3 讨 论

POCT 血糖仪的检测原理为血液与测试条中的葡萄糖氧化酶反应, 产生瞬时电流, 电流被仪器中的电流检测器测定, 并换算为相应的血糖浓度。血样中葡萄糖越低, 产生瞬时电流越强, 血糖浓度越高, 反之越低。任何对葡萄糖氧化酶产生干扰的因素都可以导致结果的偏差。POCT 血糖仪虽有其优点, 但血糖仪本身也易受外界因素如仪器性能、环境温度、湿度、取血方法及红细胞比积等干扰^[5], 标本采集应严格按快速血糖测

定, 标本采集操作规程执行, 不同采集部位, 取血方法、取血量、挤压程度对血糖有直接影响^[6]。在本实验设计中, 对血糖结果影响因素之一是红细胞比容; 血糖仪设计之初采用血样为指尖毛细血管血, 又由于试纸条采用虹吸技术吸取标本, 因此不同部位血样及操作者技术熟练程度也是影响结果可靠性的因素。

按照美国 CLSI 2002 年发布血液 POCT 血糖仪应用准则, 本研究显示指尖毛细血管血及静脉全血 POCT 血糖仪检测结果与生化分析仪检测血浆葡萄糖结果相比较均为负偏倚, 最小为 -1.5%, 最大为 -13.9%, 偏倚均小于 20%, 表明两部位血样本都可以采用。本研究也显示, 静脉全血血糖偏倚程度大于指尖血血糖, 本研究所采用病例红细胞比容均在 30%~55% 内, 因此导致上述结果可能原因是毛细血管 HCT 低于静脉血 HCT, 或毛细血管血含氧量高于静脉血^[7], 又由于仪器设计之初就采用指尖毛细血管血液, 使指尖血血糖更接近生化分析仪测定血浆葡萄糖。本研究还显示, 当血糖仪血糖浓度大于 10 mmol/L 时, 结果越高偏倚就越大, 特别是静脉全血血糖偏倚更大, 其原因可能与高血糖时细胞外液糖浓度明显高于细胞中, 葡萄糖进入细胞具有障碍性有关, 并易受血糖仪线性范围影响^[8]。因此, 当应用血糖仪检测患者血糖高于 10 mmol/L, 或做葡萄糖耐量试验时, 应在生化分析仪上测定血浆葡萄糖, 从而减少误差, 为糖尿病的诊断与治疗提供更加准确的实验室依据。

参考文献

- [1] Clinical and Laboratory Standards Institute. C30-A: Ancillary (bedside) blood glucose testing in acute and chronic care facilities; approved guideline[S]. CLSI, 2002.
- [2] 丛玉隆. POCT 的临床应用与存在问题[J]. 中华检验医学杂志, 2007, 30(12): 1325-1327.
- [3] 饶芸. 快速血糖仪测定血糖的评价及其质量控制[J]. 中国局解手术学杂志, 2003, 12(1): 20-22.
- [4] Clinical and Laboratory Standards Institute. C30-A, Ancillary (bedside) blood glucose testing in acute and chronic care facilities; approved guideline[S]. CLSI, 2002.
- [5] 丛玉隆. POCT 的临床应用与存在问题[J]. 中华检验医学杂志, 2007, 30(12): 1325-1327.
- [6] 李必浩, 王宇, 梁天北, 等. 快速血糖测定的全面质量管理[J]. 检验医学与临床, 2009, 6(14): 1204-1205.
- [7] 丛玉隆. POCT 的临床应用与存在问题[J]. 中华检验医学杂志, 2007, 30(12): 1326-1327.
- [8] 饶芸. 快速血糖仪测定血糖的评价及其质量控制[J]. 中国局解手术学杂志, 2003, 12(1): 20-22.

(收稿日期: 2010-12-10)

(上接第 793 页)

- [4] Clinical and Laboratory Standards Institute. C28-A2, how to define and determine reference intervals in the clinical laboratory[S]. CLSI, 2000: 1-31.
- [5] 杨振华, 王治国. 临床实验室质量管理[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 47-48.
- [6] 秦晓光. “检验结果”互认和质量控制[J]. 中华检验医学杂志, 2007, 30(2): 132-135.

- [7] 李金明, 申子瑜. 正确认识临床实验室认可与提高检验质量之间的关系[J]. 中华检验医学杂志, 2007, 30(2): 132-135.
- [8] 陈祥坤, 盛春永. P-选择素和胰岛素抵抗对糖尿病肾病的影响[J]. 临床和实验医学杂志, 2009, 8(2): 5-7.

(收稿日期: 2010-12-15)