

· 论 著 ·

实用 McAb-A-E 直接法检验 T 淋巴细胞亚群 实验操作步骤量化控制研究^{*}

姚伯程¹, 庞洁², 王芳¹, 田彩平¹, 李永辉³, 魏敏⁴, 毛爱红¹, 包晓玲⁵

(1. 甘肃省医学科学研究院分子生物学研究中心, 甘肃兰州 730050; 2. 甘肃省肿瘤医院检验科, 甘肃兰州 730050; 3. 甘肃省医学科学研究院转化医学中心, 甘肃兰州 730050; 4. 甘肃省肿瘤医院内镜中心, 甘肃兰州 730050; 5. 甘肃省肿瘤医院内科, 甘肃兰州 730050)

摘要:目的 对单克隆抗体 SPA 红细胞花环法(McAb-A-E)直接法试验操作步骤进行量化控制,从而对原方法进行改良。

方法 采用改良法与原方法对 23 例患者外周血中的淋巴细胞表面抗原 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺进行检测,并用配对 t 检验对两种方法的结果进行对比。改良法的量化控制主要是用一定容积的移液器混匀替代“轻轻摇匀”,以定量细胞悬液制作一定面积涂片,规范涂片细胞计数区域。**结果** 改良法与原方法检测的 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 及 CD4⁺ 与 CD8⁺ 的比值(CD4⁺/CD8⁺)结果比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 改良后的实用 McAb-A-E 直接法对细胞悬液混匀方法、细胞涂片制作和细胞计数区域进行了量化控制,可将试验操作误差降到最低。

关键词:T 淋巴细胞亚群; 实用单克隆抗体 SPA 红细胞花环法; 量化控制; 误差

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.02.005

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)02-0157-02

Study on testing T cell subsets by practical McAb-A-E with quantized control in operational process^{*}

Yao Bocheng¹, Pang Jie², Wang Fang¹, Tian Caiping¹, Li Yonghui³, Wei Min⁴, Mao Aihong¹, Bao Xiaoling⁵

(1. Molecular Biology Research Center, Medical Science Institute of Gansu, Lanzhou, Gansu 730050, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Gansu Cancer Hospital, Lanzhou, Gansu 730050, China; 3. Translation Medical Center, Medical Science Institute of Gansu, Lanzhou, Gansu 730050, China; 4. Endoscopes Center, Gansu Cancer Hospital, Lanzhou, Gansu 730050, China; 5. Department of Internal Medicine, Gansu Cancer Hospital, Lanzhou, Gansu 730050, China)

Abstract: Objective To quantize key process of direct McAb-A-E including gently shake, cell smear making and cell count, which would make some steps easier and result exactly. **Methods** A total of 23 samples were detected lymphocyte antigen levels of CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ by the original method and quantized method. In the quantized method, gently shake was replaced by pipettor, cell smear was made by quantized cell suspension, and cell count region was operated with standard. **Results** There were no significant differences on the level of CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, and the ratio of CD4⁺ and CD8⁺ between quantized method and original method ($P > 0.05$). **Conclusion** Quantizing the key process of McAb-A-E including gently shake, cell smear making and cell count could reduce error in test procedures.

Key words:T-lymphocyte subsets; monoclonal antibody-SPA-erythrocyte rosette forming; quantized; error

单克隆抗体 SPA 红细胞花环法(McAb-A-E)直接法从二十世纪九十年代起逐步被应用于医学免疫学的科研和临床,在细胞免疫学方面主要用于临床患者免疫功能的诊断。作者通过系统研究改良了 McAb-A-E 直接法,现将改良后的量化控制步骤作如下报道。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 水平式离心机(离心半径 22 cm)LDZ5-2 低速自动平衡离心机购自北京医用离心机厂; 显微镜购自日本 Olympus 公司,为 CH 型。冻干抗体致敏红细胞花环试剂—McAb 血球试剂, WuT3 0.5 mL, WuT4 0.5 mL, WuT8 0.5 mL, 由卫生部武汉生物制品研究所生产,按说明书配制。无钙、镁汉氏平衡盐溶液, pH 7.0~7.4, 分析纯(AR)试剂, 双蒸水配制,本研究中没有加酚红指示剂。淋巴细胞分离液(生化试剂)250 mL,由中国医学科学院血液学研究所提供。

1.2 方法 采用改良后的 McAb-A-E 直接法与原方法对 23 例患者外周血中的淋巴细胞表面抗原 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 进行检测^[1-3],并对两种方法的结果进行对比^[4]。改良 McAb-A-E 直接法主要步骤为:单抗红细胞悬液与被检淋巴细胞悬液混合反应,离心,静置反应后,用带吸头的移液器以 20~25 μL 容积,约 2 次/秒的速度均匀吹吸细胞悬液 15 次左右(具体的混匀次数根据每个实验室条件也可自行确定)。取混匀后的细胞悬液 10 μL ,按血片法推制面积 8~12 cm^2 的细胞涂片,按此操作涂片薄厚适宜,细胞分散均匀,细胞之间的距离和疏密程度都适合染色后高倍镜计数。选取细胞涂片的 2/6~4/6(方向从头至尾)范围内至少 2 个区域共计数 200 个细胞,计算花环形成细胞的百分率。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行数据处理及统计学分析。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用配对 t

* 基金项目:2010 年甘肃省自然科学研究基金项目(1010RJZA144)。 作者简介:姚伯程,男,副主任检验技师,主要从事免疫学和微生物学检验研究。

检验, $P < 0.05$ 为比较差异有统计学意义。

2 结 果

改良法与原方法检测的 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 及 CD4⁺ 与 CD8⁺ 的比值 (CD4⁺/CD8⁺) 结果比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 改良法与原方法结果对比 ($\bar{x} \pm s$)

方法	<i>n</i>	CD3 ⁺ (%)	CD4 ⁺ (%)	CD8 ⁺ (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
改良法	23	67.43±14.33	40.91±11.79	41.22±10.04	1.08±0.49
原方法	23	69.17±14.69	39.26±13.83	41.26±9.80	1.03±0.50
<i>t</i>	—	-1.498	0.863	-0.039	1.040
<i>P</i>	—	0.148	0.398	0.969	0.309

—: 无数据。

3 讨 论

本研究中,改良方法主要采用了三个量化控制方法使操作者能按试验量化客观控制标准进行操作,减少由试验操作者主观因素造成的误差,从而减少系统误差和随机误差,增加试验的稳定性、精密度、准确度。

3.1 对试验中重要操作步骤“轻轻摇匀”量化控制 McAb-A-E 直接法原方法试验过程中抗原-抗体结合,离心后形成淋巴细胞-致敏红细胞花环,放置一定时间后制作细胞涂片时要“轻轻摇匀”。摇匀的效果对细胞涂片的制作和细胞计数百分比影响很大。“轻轻摇匀”过程中用力过大,会使与淋巴细胞结合、但未经过固定剂固定的花环红细胞散落,从而降低花环细胞的阳性率,导致阳性花环细胞结果偏低,相对的阴性细胞值升高;“轻轻摇匀”过程中用力不够,阳性花环细胞之间由于抗体红细胞上标记抗体和淋巴细胞抗原间的相互吸引和结合,以及离心静置后形成的花环细胞团块分散不均匀,出现阳性花环细胞簇状聚集^[5],从而严重影响计数的重复性和准确度,使检验结果不稳定并偏离真实值。

另外,每个实验室所用反应试管大小形状会有一定差异,每一个操作者对“轻轻摇匀”的理解、用力强度、振幅和振摇时间的长短都有所不同。尤其是尖底离心管,混匀更加困难。因此,“轻轻摇匀”的操作会对试验结果造成一定的影响。为此对此步操作进行量化控制的研究,以达到减少不同操作者造成的人为误差。

本研究经过反复试验,用一定速度、容量和次数的加液枪吹吸混匀花环细胞沉淀来代替原方法操作中的关键步骤“轻轻摇匀”,减小或消除反应管差异和不同操作人员带来的操作误差,使不同操作者或同一操作者在每一次试验中造成的人为误差降低到最小^[6]。具体方法是用带吸头的移液器以 20~25 μL 容积,约 2 次/秒的均匀速度吹吸细胞悬液 15 次左右(具体的混匀次数根据每个实验室条件也可自行确定)。该方法混匀效果良好,又能使混匀和涂片在一次操作中完成(原方法要分 2 步才能完成),不但操作简单,而且节省时间。

3.2 细胞涂片制作量化控制 细胞涂片的薄厚均匀直接影响细胞识别和细胞计数。涂片厚,会增加花环阳性细胞数,降低阴性细胞数。反之,会增加阴性细胞数,降低阳性花环细胞

数^[7]。因此,用定量的细胞悬液和规定推制面积的方法,规范细胞涂片的制作,可达到减少误差,稳定试验的目的。

具体方法为取混匀后的 10 μL 细胞悬液,按血片法推制面积 8~12 cm^2 的细胞涂片。按此操作制作的细胞涂片薄厚适宜,细胞分散均匀,细胞之间的距离和疏密程度都适合染色后高倍镜计数。

操作者在制作细胞涂片时,对细胞花环结合物悬液的取样量及制片面积的量化控制,保证了细胞涂片的薄厚、均匀以及细胞分散效果。量化控制操作是避免操作人员主观因素导致试验误差增加的重要步骤,也使操作人员不受反应管类型、操作时间及操作地点的影响,从而减小系统误差和随机误差,增加试验的稳定性和精密度。

目前,白细胞分类计数的参考方法仍然是手工分类法,即把血涂片进行瑞氏染色后,在显微镜下对各种白细胞进行分类。手工分类法的不足之处在于:(1)技术人员进行细胞分类时,存在主观因素的影响;(2)由于单核细胞、嗜碱性粒细胞数量较少,分类时不能保证其结果准确度和精密度;(3)血片细胞分布不均。说明涂片时细胞的均匀分布对手工法细胞计数结果有重要影响。

3.3 细胞计数的区域规范 用 McAb-A-E 直接法检验 T 淋巴细胞亚群推片法制作的细胞涂片与血常规白细胞分类涂片相同,但是效果又不完全一样,细胞涂片的不同区域对阴、阳性细胞计数均匀性有一定影响。为使误差减少到最小,可通过规范细胞涂片进行细胞计数的区域和方法,以保证计数结果的代表性和稳定性。本研究参照血常规白细胞分类涂片和计数的相关技术,对 McAb-A-E 直接法细胞涂片花环计数的区域做了相应规范。经过实践应用,效果较好。

规范细胞计数的区域的具体方法是在计数时,选取细胞涂片的 2/6~4/6(方向从头至尾)范围内至少 2 个区域共计数 200 个细胞,算出花环形成细胞的百分率。通过上述规范,使每个操作者都能把显微镜下细胞计数过程引起的误差降到最低,保证和提高了检测的准确度。

参 考 文 献

- [1] 中华人民共和国卫生部医政司. 全国临床检验操作规程 [M]. 3 版. 南京: 东南大学出版社, 2006: 381-384.
- [2] 姚伯程. 单克隆抗体 SPA 红细胞花环法检验淋巴细胞亚群的方法: 中国, ZL 200710018523.9[P]. 2007-8-1.
- [3] 姚伯程. 单克隆抗体 SPA 红细胞花环法检验淋巴细胞亚群的间接法: 中国, ZL 200710199298.3[P]. 2007-12-6.
- [4] 马斌荣. 医学统计学 [M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2001.
- [5] 姚伯程, 王怡云. 分离液对 T 细胞阳性花环和非 T 细胞阳性花环计数结果影响的研究 [J]. 国际检验医学杂志, 2011, 30(1): 1-2.
- [6] 郁爱华, 田文斌, 姚伯程. EDTA 抗凝剂在 McAb-A-E 直接法实用新方法中的应用研究 [J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(3): 455.
- [7] 王红洲, 姚伯程. 实用 McAb-A-E 直接法在诊断血液性疾病细胞免疫功能中的应用 [J]. 甘肃医药, 2013, 32(9): 698-699.

(收稿日期: 2014-08-26)