

## • 论 著 •

**实用 McAb-A-E 直接法检验 T 淋巴细胞亚群细胞计数误差研究\***

姚伯程

(甘肃省医学科学研究院分子生物学研究中心,甘肃兰州 730050)

**摘要:**目的 研究和评价实用单克隆抗体 SPA 红细胞花环直接法(简称实用 McAb-A-E 直接法)检验 T 淋巴细胞亚群细胞涂片细胞计数随机误差,并与 McAb-A-E 直接法原方法比较。方法 随机选取 20 例样本,在涂片的 2/6~4/6 区域间至少 2 个区计数 200 个细胞,计数区域不重复,CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> 连续计数 4 次,CD3<sup>+</sup> 连续计数 2 次。结果 实用 McAb-A-E 直接法细胞计数随机误差分别为 CD3<sup>+</sup>:7.86, CD4<sup>+</sup>:9.99, CD8<sup>+</sup>:8.55, CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>:0.33, 低于 McAb-A-E 直接法原方法误差,即 CD3<sup>+</sup>:15.00, CD4<sup>+</sup>:13.80, CD8<sup>+</sup>:10.70, CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>:0.69。结论 实用 McAb-A-E 直接法细胞计数随机误差小于 McAb-A-E 直接法原方法。

**关键词:**随机误差; 细胞计数; 评价; 实用 McAb-A-E 直接法; T 淋巴细胞亚群检验

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.15.043

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)15-2228-02

**Study on cell counting random error of the practical McAb-A-E direct method for cell sheet of T lymphocyte subsets\***

Yao Bocheng

(Molecular Biology Research Center, Gansu Province Academy of Medical Sciences, Lanzhou, Gansu 730050, China)

**Abstract: Objective** To research and evaluate cell counting random error for cell sheet of T lymphocyte subsets in the practical McAb-A-E direct method, and old method of McAb-A-E direct method compared. **Methods** Randomly selected 20 specimens, cell sheet of T lymphocyte subsets on counting 200 cell at least 2 area from 2/6~4/6 area, counting area non-repeated, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> continuous counter 4 times, CD3<sup>+</sup> continuous counter 2 times. **Results** In the practical McAb-A-E direct method, random error mean of cell counting was separately CD3<sup>+</sup>:7.86, CD4<sup>+</sup>:9.99, CD8<sup>+</sup>:8.55, CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>:0.33, lower than old method of McAb-A-E direct method, that was CD3<sup>+</sup>:15.00, CD4<sup>+</sup>:13.80, CD8<sup>+</sup>:10.70, CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>:0.69. **Conclusion** Cell counting random error in practical McAb-A-E direct method for cell sheet of T lymphocyte subsets is less than old method of McAb-A-E direct method.

**Key words:** random error; cell counting; evaluation; practical McAb-A-E direct method; T lymphocyte subsets test

实用单克隆抗体 SPA 红细胞花环直接法(简称实用 McAb-A-E 直接法)因冻干抗体致敏红细胞花环试剂具有特异性强、敏感、稳定性好、有效期长、使用方便的特点,不需使用特殊仪器,仅需普通光学显微镜即可,且实验结果可保存两星期等优越性。然而,实用 McAb-A-E 直接法用于 T 淋巴细胞亚群细胞检验,细胞涂片细胞计数的代表性和随机误差影响检验结果的准确性,为此,进行实用 McAb-A-E 直接法细胞计数随机误差研究,并与 McAb-A-E 直接法原方法进行比较,明确其二者差异。

**1 材料与方法****1.1 试剂**

**1.1.1** McAb-A-E 试剂 McAb 血球试剂, WuT3 0.5 mL; McAb 血球试剂, WuT4 0.5 mL; McAb 血球试剂, WuT8 0.5 mL。按说明书配制。

**1.1.2 改良吉姆萨氏染色液** 瑞氏粉 0.5 g, 吉姆萨氏粉 2 g, 碱性美兰粉 0.5 g, 将上述成分加 10 mL 甘油(丙三醇), 在玻璃研钵中不断研磨并逐渐加入甲醇使之完全溶解, 补加甲醇稀释至 500 mL 备用。

**1.1.3 20% 新生小牛血清无钙、镁 Hank'S 液** 在无钙、镁 Hank'S 液 100 mL 中加入新生小牛血清 20 mL, 混匀, 在超净台分装在无菌青霉素小瓶或小离心管中, 每管 1~2 mL, 置冰箱冷冻箱中冷冻保存<sup>[1]</sup>。

**1.2 器材** 水平式离心机(离心半径 22 cm)、LDZ5-2 低速自动平衡离心机 北京医用离心机厂; 显微镜 OLYMPUS CH 型日本。

**1.3 方法**

**1.3.1 实用 McAb-A-E 直接法** 抗凝外周血并稀释, 800~1 200 r/min 离心 15~20 min, 用淋巴细胞分离液分离单个核细胞(PBMC), 配成  $(400 \sim 600) \times 10^6 / \text{mL}$  PBMC 悬液备用。取 PBMC 悬液与抗体致敏红细胞悬液等量混合, 室温(18~28 °C)反应 10 min, 300 r/min 离心 5 min, 在 4 °C 放置 30 min, 取混合悬液推制细胞涂片, 自然干燥, 改良吉姆萨染色法染色 4~6 min, 湿片在高倍镜下计数。

**1.3.2 McAb-A-E 直接法原方法** 抗凝外周血并稀释, 2 000~2 500 r/min 离心 20~30 min, 用淋巴细胞分离液分离单个核细胞(PBMC), 配成  $500 \times 10^6 / \text{mL}$  PBMC 悬液, 20°倾斜放置 37 °C 45 min, 吸出细胞悬液于另一离心管中, 1 000~1 500 r/min 离心 5~10 min, 弃上清, 恢复为原量备用。取 PBMC 悬液与抗体致敏红细胞悬液等量混合, 室温(18~28 °C)反应 10 min, 500 r/min 离心 10 min, 在室温下继续放置 1 h, 在 4 °C 放置 2 h 或过夜, 轻轻悬浮后加入 25 μL 梅格氏染液, 1 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 加 50 μL 的吉姆萨液染色 30 min, 取 1 滴于玻片上加盖玻片, 在高倍镜下计数。

**1.3.3 细胞涂片制作** 实用 McAb-A-E 直接法检验人外周

\* 基金项目: 甘肃省自然科学基金计划资助项目(1010RJZA144)。 作者简介: 姚伯程,男,副主任检验技师,主要从事免疫学、微生物学检验及研究。

血中的淋巴细胞表面抗原 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>。所得抗原-抗体细胞悬液用带吸头的移液器 25 μL 容积吹吸混合悬液 15 次;取 10 μL 混合悬液按血片法推制面积 8~10 cm<sup>2</sup> 的细胞涂片,自然干燥后用改良吉姆萨染色法染色,湿片下高倍镜计数。

**1.3.4 细胞计数方法** 在细胞涂片的 2/6~4/6 区域间至少 2 区计数 200 个细胞,计数区域不重复,CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> 计数 4 次,CD3<sup>+</sup> 连续计数 2 次,数据先后按计数次序排序,观察其计数结果在各次计数时存在的误差。

**1.3.5 计算标准差** 20 例样本 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 连续 4 次计数所得数据求其平均值,再进行统计学分析,求其相应标准差并与原方法比较。

**1.3.6 允许总误差计算** 根据参考值与参考范围而定的允许总误差标准计算公式:可允许误差限度(%)=±(1/4)[(参考值上界-参考值下界)/参考值均数]×100%,最大允许误差定为±10%。

**1.4 统计学处理** 计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示,用 SPSS13.0 统计软件进行描述性统计学分析,计算出细胞计数标准差和随机误差,并与原方法比较。以国际上[美国联邦登记 2,28,1992;57(40):7002-186]生物学质量规范(血液学)要求标准,对新方法作出客观科学评价。

## 2 结 果

**2.1 实用 McAb-A-E 直接法与原方法误差比较** 用 SPSS 13.0 统计软件对实用 McAb-A-E 直接法检验 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 结果经描述性统计<sup>[2]</sup>,分别计算出随机误差。根据根据生物学变异制定的标准,白细胞分类的误差为靶值±3s 的要求,CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 均在标准范围。结果见表 1(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

**2.2 根据参考值与参考范围而定的允许总误差标准比较** 例如 CD3<sup>+</sup> 可允许误差限度(%)=±(1/4)[(73.86-58.14)/66.0]×100% = ±5.98%。实用 McAb-A-E 直接法 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 可允许误差限度分别为±5.98%、11.40%、13.65%;男:11.78,女:10.03。McAb-A-E 直接法原方法 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 可允许误差限度分别为±7.40%、10.30%、11.20%;男:17.10,女:13.50。

**2.3 根据生物学变异制定的允许总误差标准比较** 基于生物学变异的血液学质量规范,可接受性能:白细胞分类:靶值±3s(基于不同类型白细胞的百分数);细胞识别:在识别上 90% 或更高的一致性;白细胞计数:靶值±15%。依据正常参考值,则 CD3<sup>+</sup>(66±9.9)%;CD4<sup>+</sup>(43.8±6.53)%;CD8<sup>+</sup>(31.3±4.70)%;CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 男:(1.40±0.21)%;女:(1.59±0.24)%。实用 McAb-A-E 直接法和原方法标准差可知,均符合和接近此误差要求。

## 3 讨 论

随机误差是测量结果与在重复性条件下,对同一被测量进行无限多次测量所得结果的平均值之差。精密度是指在一定条件下进行多次测量时,所得测定结果之间的符合程度。精密度无法直接衡量,往往以不精密度表达,常用标准差表示。较小的标准差表示有较高的精密度。可用一个样本的重复测定结果,或由多个样本多项重复测定所得的信息合并在一起来估计精密度。精密度由随机误差决定的。因此,要使一个方法得到较高准确度测定结果,必须使随机误差较小,标准差较小,才能有较高的精密度,才能提高该方法的准确度,也才能使测定

结果与真值接近一致<sup>[3]</sup>。根据准确度与精密度之间的关系,要使准确度高,精密度一定要高,精密度高是保证准确度高的前提。

根据检验项目的分析质量规范,可表现为允许不精密度(CV%),允许偏倚和允许总误差等,其中,最重要的是允许总误差要求,它是医学实用性所能耐受的分析误差的大小。医学实验室所使用的方法要求在 CV%、不准确度和总误差上应小于这些分析质量规范技术要求。

允许总误差制定的常用方法如下。(1)根据参考值制定标准:根据参考值与参考范围而定的标准,这是研究者在 1963 年提出的,其公式为可允许误差限度(%)=±(1/4)[(参考值上界-参考值下界)/参考值均数]×100%,最大允许误差定为±10%,但对某些物质(如酶)则提高到±20%。(2)根据临床观察制定的标准。(3)根据生物学变异(生理变异)制定的标准。美国和欧洲分别提出了各项目的可接受的允许误差范围。基于生物学变异的血液学质量规范,可接受性能为白细胞分类:靶值±3s(基于不同类型白细胞的百分数);细胞识别:在识别上 90% 或更高的一致性;白细胞计数:靶值±15%<sup>[4]</sup>。

根据参考值与参考范围的标准,实用 McAb-A-E 直接法 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 的误差虽然超过最大允许误差 10% 的要求,但是都很接近,且优于原方法。细胞计数类似于手工法白细胞分类,因此,细胞计数随机误差也应与此质量规范要求相一致。以国际上[美国联邦登记 2,28,1992;57(40):7002-186]生物学质量规范(血液学)要求标准,实用 McAb-A-E 直接法(新方法)测定结果误差评价:(1)实用 McAb-A-E 直接法测定结果的标准差小于原方法参考范围的标准差;(2)实用 McAb-A-E 直接法靶值±3s 小于原方法参考范围的靶值±3s;(3)实用 McAb-A-E 直接法测定结果小于或接近最大允许误差定为±10% 标准;(4)实用 McAb-A-E 直接法满足或接近满足基于生物学变异的血液学质量规范,白细胞计数:靶值±15% 要求;(5)结论:实用 McAb-A-E 直接法用于 T 淋巴细胞亚群检验,细胞计数标准差和细胞计数随机误差小于原方法。

综上所述,实用 McAb-A-E 直接法经过实验新程序设计,简化了步骤,减少了人为造成操作误差,减少了设备仪器和试剂造成的误差,因此降低了系统误差和随机误差,显著提高了精密度,因此提高了准确度<sup>[5]</sup>。

## 参 考 文 献

- [1] 叶应妩,王毓三,申子瑜.全国临床检验操作规程[M].3 版.南京:东南大学出版社,2005:381-384.
- [2] 马斌荣.医学统计学[M].3 版.北京:人民卫生出版社,2001.
- [3] 彭黎明,李丽娟,彭志勇,等.几种血细胞分析仪结果的比对和质控[J].中华检验医学杂志,2000,23(2):94-97.
- [4] 王治国.临床检验质量控制技术[M].北京:人民卫生出版社,2007:342-348.
- [5] 姚伯程,田彩平,赵晓玲,等.实用 McAb-A-E 直接法检验 T 淋巴细胞亚群 PBMC 细胞自然形态保持研究[J].甘肃医药,2015,34(1):12-14.

(收稿日期:2015-02-22)

