

• 论 著 •

基于 WS/T 405-2012 行标的血细胞分析参考区间验证

魏红璐, 王 萍[△]

(重庆市第五人民医院检验科, 重庆 400062)

摘 要:目的 探讨《WS/T 405-2012 血细胞分析参考区间》(简称 WS/T 405-2012)是否适用于该实验室所在区域人群及实验室检测系统。方法 根据《WS/T 402-2012 临床实验室检验项目参考区间的制定》(简称 WS/T 402-2012)与 WS/T 405-2012 文件要求,选择健康参考个体 40 例(男、女各 20 例),采用性能评价符合要求的 Sysmex XN-1000 全自动血液分析仪检测血液标本,对 WS/T 405-2012 中血细胞分析项目的参考区间进行验证。结果 参与验证的血细胞分析项目测定结果均符合 WS/T 402-2012 要求。结论 WS/T 405-2012 规定的血细胞分析参考区间可用于该实验室。

关键词:血细胞分析; 参考区间; 验证

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.05.017

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)05-0621-03

Validation for reference intervals of blood cell analysis based on WS/T 405-2012

Wei Honglu, Wang Ping[△]

(Department of Clinical Laboratory, the Fifth People's Hospital of Chongqing City, Chongqing 400062, China)

Abstract: Objective To explore whether or not the WS/T 405-2012 reference intervals for blood cell analysis (WS/T 405-2012) was suitable for population in this area and testing systems in this laboratory. **Methods** According to the requirements of documents WS/T 402-2012 define and determine the reference intervals in clinical laboratory (WS/T 402-2012) and WS/T 405-2012, 40 cases of healthy individuals, including 20 male cases and 20 female cases, were selected. The blood samples were detected by using the Sysmex XN-1000 automatic blood cell analyzer which had met the requirements of performance assessment, then reference intervals of blood cell analysis from WS/T 405-2012 were verified. **Results** The detection results of all items of blood cell analysis involved in this validation met requirements of WS/T 402-2012. **Conclusion** The reference intervals of blood cell analysis from WS/T 405-2012 could be applied for this laboratory.

Key words: blood cell analysis; reference interval; validation

本室血细胞分析项目的参考区间一直沿用《全国临床检验操作规程》(第 3 版)上的参考范围或采用试剂、仪器厂家提供的参考区间,而上述范围均不是建立在本地区人群基础上的参考区间。由于年龄、性别、居住环境、民族、饮食习惯的差异,以及检验方法的不同,同一检测项目使用不同的检测系统或不同来源的试剂都会使检测结果不一致。目前,大多数医院并未对所使用的参考区间进行验证,而进行了参考区间验证的实验室多参照美国临床实验室标准化委员会(NCCLS)相关文件要求。原卫计委选取东北、华北、西北、华东、华南和西南 6 地城乡居民,建立我国居民血常规项目的参考区间,并采用《WS/T 402-2012 临床实验室检验项目参考区间的制定》(简称 WS/T 402-2012)行标^[1]对参考区间的验证方法进行标准化。为了确保原卫计委规定的参考区间适用于本实验室,本研究按照行标要求对血细胞分析参考区间进行验证,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 标本来源 2013 年 7 月 12~15 日于本院进行健康体检并取得知情同意者,向其发放健康调查表,根据 WS/T 402-2012 标准^[1]筛选出符合以下条件的人群:(1)年龄、性别等信息全面;(2)近期无就医治疗或住院史,未接受手术,未服药,未输血;(3)无出血史(包括牙龈出血、血尿等);(4)无以下各种疾病如消化系统疾病(肝硬化、肝炎、消化性溃疡、慢性腹泻、炎性肠炎等)、慢性感染(结核、梅毒等)、肾病、风湿性疾病、代谢和

营养相关疾病(糖尿病)、甲状腺疾病、血液系统疾病(白血病、贫血)、肿瘤、高血压等;(5)无特殊饮食;(6)无消瘦、营养不良;(7)定期运动;(8)无吸烟、饮酒嗜好;(9)女性未处于妊娠、月经及哺乳期,并且记录采血情况,要求采血顺利,血液标本采集后在 2 h 内检测完毕。

1.2 仪器与试剂 日本 Sysmex XN-1000 全自动血液分析仪(简称 XN-1000)及原装进口配套试剂,质控品由四川新成生物科技有限责任公司提供,乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K₂)抗凝静脉真空采血管。

1.3 方法

1.3.1 实验前仪器准备 对 XN-1000 进行校准,性能验证后各项参数均达标,最近一次室内质评结果合格,实验当天室内质控结果良好。

1.3.2 参考人群数量和年龄分布 根据《WS/T 405-2012 血细胞分析参考区间》(简称 WS/T 405-2012)标准^[2]给出的参考区间进行验证。男女使用相同参考区间的项目选取男、女受试者各 10 例,年龄 23~74 岁;男女使用不同参考区间的项目,选取男、女各 20 例,男性年龄 24~77 岁,女性年龄 22~74 岁。

1.3.3 观察项目 白细胞(WBC)计数、红细胞(RBC)计数、血红蛋白(Hb)、血细胞比容(Hct)、血小板(PLT)计数、中性粒细胞(N)绝对值与百分比、淋巴细胞(L)绝对值与百分比、嗜酸性粒细胞(E)绝对值与百分比、嗜碱性粒细胞(B)绝对值与百分

比、单核细胞(M)绝对值与百分比、平均红细胞体积(MCV)、平均红细胞血红蛋白含量(MCH)、平均红细胞血红蛋白浓度(MCHC)。

1.4 统计学处理 首先对验证数据进行离群值判断,按照 Dixon 方法剔除各组离群值;如剔除离群值后样本量不足,需补足,补足后再进行离群值判断,直到满足要求。然后将数据与需验证参考区间进行比较,若落在参考限外的测定值不超过 2 个,则该参考区间可以使用;若超过 2 个测定值在参考限外,则重新收集标本进行上述验证过程。方法学统计使用 Excel2003 软件。

2 结 果

2.1 XN-1000 的性能评价 该仪器 WBC、RBC、Hb、Hct、PLT 的不精密度、携带污染率及线性范围均符合仪器厂家标准。见表 1。

表 1 XN-1000 的性能评价

项目	不精密度(%)		携带污染率 (%)	线性范围	性能 评价
	手动	自动			
WBC	1.91	2.96	0.1	(0.00~261.88)×10 ⁹ /L	符合
RBC	0.82	0.62	0.1	(0.00~9.52)×10 ¹² /L	符合
Hb	0.80	0.96	0.5	0.00~291.70 g/L	符合
Hct	0.83	0.55	0.1	0.00~0.91 L/L	符合
PLT	1.86	3.02	0.1	(0.00~1 035.30)×10 ⁹ /L	符合

2.2 各血细胞分析项目验证结果 各项血细胞分析项目测定值超出参考区间的个数均未超过 2,其中 WBC 计数、N 绝对值、E 绝对值、N 百分比、L 百分比、E 百分比、B 百分比、M 百分比、PLT 计数、MCV、MCH、MCHC、女性 RBC 计数、男女 Hb 及女性 Hct 均无超出参考区间的测定值,L 绝对值、B 绝对值、M 绝对值、男性 RBC 计数超出参考区间的测定值个数均为 1,男性 Hct 超出参考区间的测定值个数为 2。各血细胞分析项目的新标准参考区间均可用于本实验室。各项指标受试者检测结果,见表 2~4(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”);各血细胞分析项目参考区间验证结果,见表 5。

表 5 各血细胞分析项目参考区间验证结果

项目	验证参考区间	健康参考个体范围
WBC(×10 ⁹ /L)	3.50~9.50	4.33~8.68
N 绝对值(×10 ⁹ /L)	1.80~6.30	2.12~6.00
L 绝对值(×10 ⁹ /L)	1.10~3.20	1.08~2.85
E 绝对值(×10 ⁹ /L)	0.02~0.52	0.06~0.27
B 绝对值(×10 ⁹ /L)	0.00~0.06	0.01~0.07
M 绝对值(×10 ⁹ /L)	0.10~0.60	0.30~0.73
N 百分比(%)	40.00~75.00	44.00~69.10
L 百分比(%)	20.00~50.00	22.30~45.80
E 百分比(%)	0.40~8.00	0.90~4.50
B 百分比(%)	0.00~1.00	0.20~1.00
M 百分比(%)	3.00~10.00	4.40~9.20
PLT(×10 ⁹ /L)	125.00~350.00	128.00~296.00
MCV(fL)	82.00~100.00	85.90~96.80

续表 5 各血细胞分析项目参考区间验证结果

项目	验证参考区间	健康参考个体范围
MCH(pg)	27.00~34.00	26.80~31.80
MCHC(g/L)	316.00~354.00	321.00~341.00
RBC(×10 ¹² /L)		
女	3.80~5.10	3.83~4.73
男	4.30~5.80	4.57~6.11
Hb(g/L)		
女	115.00~150.00	120.00~145.00
男	130.00~175.00	138.00~174.00
Hct(L/L)		
女	0.35~0.45	0.37~0.44
男	0.40~0.50	0.46~0.53

3 讨 论

本次参考区间验证选取的参考人群年龄范围为 20~80 岁,每 10 岁选取两个健康体检者纳入验证人群,结果显示原卫计委发布的血细胞分析项目参考区间能够用于本实验室。但是,由于 RBC 计数和 Hb 的参考区间与之前的标准已不同,因此在临床应用上如输血指标、贫血程度判断指标等是否需要修改还需要进一步的探讨。此外,特殊人群如孕妇、各年龄段儿童的参考区间也需要进一步制订。

在本次参考区间验证过程中,笔者开始发现本实验室男性 MCHC 参考区间无法通过验证,但是 RBC 计数、Hb、Hct、MCV、MCH 等 RBC 相关项目的参考区间都能通过验证。因此,笔者将男性 MCHC 的均值与原卫计委给定参考区间的中位数进行比较,发现男性 MCHC 的均值远高于参考区间中位数,由于选取参考人群样本量较小(20 例),于是笔者回顾了实验室近一个月参与体检的男性 MCHC 测定值,发现超过 20% 的男性 MCHC 值在参考区间的上限。而本次参考区间验证前已对用于参考区间验证的仪器进行了校准及性能评价,且在性能评价符合要求后进行参考区间验证试验,因此笔者认为仪器性能符合要求,考虑是仪器校准问题。由于 MCHC 是计算值,Hb 与 RBC 共同影响下可导致 MCHC 测定值较大的偏差,于是对仪器进行重新调试,纠正了仪器出厂后一般不需要修改的参数值,经调试校准后再重新进行参考区间验证,结果 MCHC 参考区间通过验证。通过本次参考区间的验证,发现并解决了本实验室在平时标本检测中发现 MCHC 结果偏高的问题,在仪器处于正常状态和标本采集方法正确的情况下,本地区人群的 PLT 参考区间也能顺利通过验证,说明判断本地区 PLT 普遍偏低的现象是有误的。本次验证试验表明,在做参考区间验证试验的过程中若发现参考区间不合适,并不要盲目地认为此参考区间不适用于本实验室或者不采取措施马上重新收集参考人群标本进行重新验证,应该检查仪器的校准记录与性能评价结果,查看是否是因为准确度的偏移或者仪器本身原因导致参考区间验证无法通过,再重新收集标本进行验证。

生物参考区间是医生判断患者正常和出现异常的参考标准,建立合适的参考区间对临床判断机体健康与否具有重要意义。但是,按照国际临床化学协会提出的建立实验室生物参考区间的方法建立各实验室的参考区间又存在(下转第 625 页)

0.900,以 9.1 ng/mL 为临界值,该方法的灵敏度为 95%,特异度 80%。见图 2。

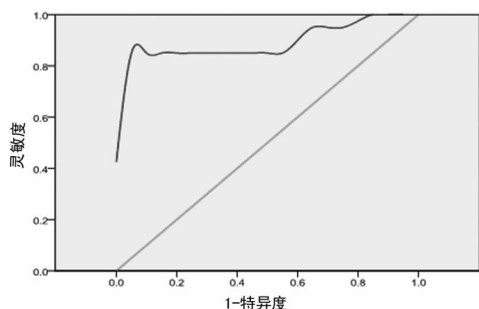


图 2 检测胸腔积液中 ESAT-6 的 ROC 曲线

3 讨 论

传统的免疫学检测方法常采用同位素、荧光素、生物素或者酶作为免疫反应的指示剂,反应支持介质多为聚丙烯孔板、琼脂等,具有一定的局限性,并且部分指示物具有环境污染性,或者宜受环境因素的影响,信号放大能力弱。此外,固体介质作为反应支持物,可能对蛋白质的构象展开有影响,不利于抗原抗体反应的进行。本研究首次采用 Dylight 800 这种新型近红外荧光染料作为免疫反应的高效信号指示剂,利用其荧光强度高、荧光寿命长、稳定性好、生物相容性优的特点^[4-6],同时采用了纳米磁珠作为反应支持平台,将免疫反应的分离和富集连为一体,以 ESAT-6 作为检测对象,建立了定量检测的方法。

Dylight800 标记抗体,操作简便,标记效率高,据试剂盒提供的数据表明,其标记效率约为 87%,优于其他种类的标记物。本方法的批内和批间 CV 分别为 4.3%、5.8%,可以体现 Dylight800 荧光寿命长、稳定性好的特点,因而其在临界值灰区判定可能具有优势。同时,稳定的检测结果可为临床治疗效果的评价及试验结果的判断提供可靠的参考依据。

Dylight 800 作为免疫反应信号指示剂,由于其激发光和发射光波长均在近红外波长区域内,可见光波长范围外,所以在本研究的特异性评价试验中,除了结核分枝杆菌标准株(H37Rv ATCC27294)在测试时可检出反射光以外,其他菌株或产生极其微弱的发射光或未检出光强度,表明其抗外界干扰能力强。

纳米磁珠在本研究中作为反应支持平台,具有比表面积大,吸附性强,悬浮稳定性好的优点。与 Dylight 800 共同搭建起来的免疫反应系统,近似于液体环境,有利于蛋白质空间构

象的完整展开,将免疫反应的分离和富集连为一体,使得抗原抗体反应能够顺利进行。

胸腔积液是一个很好的培养基,结核菌在生长过程中产生的分泌蛋白不可避免地漏于其中,同时胸腔积液也是一个很好的富集环境,适于作为检测样品。在以 ESAT-6 为靶目标的结核分枝杆菌检测临床研究中,多数学者关注患者血清和脑脊液中 ESAT-6 的表达^[3,7],并取得了满意的结果。在本研究中,初步尝试用建立的方法对胸腔积液 ESAT-6 水平进行检测,从而鉴别诊断胸腔积液的性质,结果显示检测的特异度为 80%,灵敏度为 95%。但是,本研究由于缺少足够量的临床标本,因而所得结果具有一定的局限性,其临床意义还需要大量的临床标本检测数据和方法学对比来进行验证。

综上所述,本研究仅对纳米磁珠-近红外荧光标记的免疫反应体系的应用进行了初步研究,结果表明其检测性能满意。

参考文献

- [1] Jones DA, Guha K, Ho TB. Notification of tuberculosis in an area of low TB incidence[J]. Clin Med(Lond), 2008, 8(6): 637.
- [2] 杨华, 张丽婷, 李连青, 等. 结核分枝杆菌 H37Rv 结合肽的筛选研究[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2011, 34(3): 192-196.
- [3] 李新玲, 黄怀宇, 吴俊渊, 等. 时间分辨荧光免疫法检测脑脊液结核分枝杆菌特异性抗原的诊断价值[J]. 中华医院感染学杂志, 2012, 22(18): 4168-4170.
- [4] Jaiswal JK, Mattoussi H, Mauro JM, et al. Longterm multiple color imaging of live cells using quantum dot bioconjugate[J]. Nat Biotechnol, 2002, 21(1): 47-51.
- [5] Pellegrino T, Minchew CL, Shumfn S, et al. Hydrophobic nanocrystals coated with an amphiphilic polymer shell: a general route to water soluble nanocrystals[J]. Nano Lett, 2004, 4(4): 703-707.
- [6] 付志英, 李朝辉, 何晓晓, 等. 水溶性量子点荧光探针用于胃癌细胞相关抗原 CA242 的检测[J]. 分析化学, 2006, 34(12): 1669-1673.
- [7] 石洁, 朱岩昆, 马晓光, 等. 结核分枝杆菌早期分泌靶抗原和抗原 85B 融合蛋白的原核表达及其在血清学检测中的初步应用[J]. 中国病原生物学杂志, 2015, 10(5): 389-392.

(收稿日期: 2015-12-19)

(上接第 622 页)

客观难度^[3], 每个实验室的每个检测项目及不同检测系统分别建立参考区间并不现实, 根据 NCCLS C28-A2 文件^[4]及 WS/T 402/2012 文件^[1]的要求进行实验室参考区间验证, 更加方便实验室项目的开展。虽然原卫计委针对我国人群建立了各检测项目相应的参考区间, 形成 WS/T 405/2012 标准^[2], 但是由于各地气候、海拔、民族、饮食存在差异, 加上各实验室使用仪器厂家不同, 在此种情况下, 实验室也有必要对标准中的参考区间进行验证, 以判断该参考区间是否能够用于本地区人群。

参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部. WS/T 402-2012 临床实验室检验项目参考区间的制定[M]. 北京: 中国标准出版社, 2012.

- [2] 中华人民共和国卫生部. WS/T 405-2012 血细胞分析参考区间[M]. 北京: 中国标准出版社, 2012.
- [3] Solberg HE, Stamm D. IFCC recommendation; the theory of reference values. Part 4. Control of analytical variation in the production, transfer and application of reference values[J]. J Automat Chem, 1991, 13(5): 231-234.
- [4] National Committee for Clinical Laboratory standards. C28-A2 How to define and determine reference intervals in the clinical laboratory[S]. Wayne, PA, USA: NCCLS, 2000.

(收稿日期: 2015-12-11)

