

[文章编号] 1000-2200(2010)08-0828-03

· 检验医学 ·

## 流式细胞仪检测网织红细胞百分比性能评价

刘小林, 周彦, 孙林

**[摘要]** 目的:评价流式细胞仪测定外周血中网织红细胞(reticulocyte, Ret)百分比的性能。方法:应用流式细胞仪检测外周血 Ret 百分比,进行准确性、重复性及稳定性测试,并同时与手工计数结果比较,进行线性评价。结果:流式细胞仪检测外周血 Ret 百分比日间精密度与日内精密度 CV 均 < 0.36%,稳定性好;4℃低温 24 h 内 Ret 百分比计数 CV < 0.43%,随着样本放置时间的延长,计数结果略有上升,不影响临床诊断;与同期手工法结果呈正相关关系( $P < 0.01$ )。结论:流式细胞仪测定 Ret 百分比准确性高,重复性、稳定性好,速度快,灵敏度高,纯度高,能满足临床需要,可替代手工计数。

[关键词] 流式细胞术;网织红细胞;检测

[中国图书资料分类法分类号] R 446.61 [文献标识码] A

### Evaluation on performance of reticulocytes detection by flow cytometry

LIU Xiao-lin, ZHOU Yan, SUN Lin

(Department of Hemaology, The Second People's Hospital of Lianyungang, Lianyungang Jiangsu 222023, China)

**[Abstract]** **Objective:** To evaluate the detection of reticulocytes by flow cytometry comprehensively. **Methods:** The percent of peripheral blood reticulocytes was detected by flow cytometry. The precision reproducibility and stability were observed. The results were compared with manual method and evaluated linearly. **Results:** Precision CV of the indexes was less than 0.36%, which had a good stability. And the percentage CV at 4℃ in 24 hours was less than 0.43%. With the prolongation of storage time of samples, the results increased slightly, but no effect on clinical diagnosis. It had a positive correlation with manual methods ( $P < 0.01$ ). **Conclusions:** Analyzing reticulocytes by flow cytometry is a simple, fast, accurate, stable method and has a good reproducibility. It can meet clinical requirement and replace manual methods.

[Key words] flow cytometry; reticulocyte; measurement

网织红细胞(reticulocyte, Ret)是介于晚幼红细胞和成熟红细胞之间的过渡段细胞,略大于成熟红细胞,其胞质中残存的嗜碱性物质 RNA 等源自有核红细胞,这种嗜碱性物质经碱性染料活体染色后,形成蓝色或紫色的点粒状或丝网状结构沉淀物<sup>[1]</sup>。传统检测 Ret 百分比是手工计数 1 000 个经煌焦油蓝或新亚甲蓝活体染色细胞,胞质中可见核酸与碱性染料复合物,并计算其个数。因其存在诸多缺点,已经逐渐被流式细胞仪取代。本研究采用流式细胞仪的新型检测技术进行 Ret 百分比性状的分析调查,旨在为临床相关疾病的诊断和治疗以及预后监测提供准确信息。

### 1 资料与方法

#### 1.1 一般资料

1.1.1 标本来源 2007~2009 年连云港市第二人民医院临床确诊溶血性贫血患者 50 例,男 28 例,女 22 例;年龄 17~74 岁。另选健康体检者 100 名,男 50 名,女 50 名;年龄 20~60 岁。其血常规的各项参数均在正常范围内。

1.1.2 仪器与试剂 美国 BD 公司流式细胞分析仪及原装配套试剂,日本 OLYMPUS BX-60 型多功能光学显微镜,珠海贝索公司 Ret 染液和瑞氏染液,均按试剂使用说明书操作。

#### 1.2 方法

1.2.1 标本采集 EDTA-K2 血常规真空采血管抽取抗凝全血 2 ml。

1.2.2 操作步骤 煌焦油蓝法<sup>[2]</sup>,按全国临床检验操作规程操作。流式检测法,将 Falcon 试管顺序编号,制备阴性对照管。Falcon 阴性对照管中加入含 0.1% NaN<sub>3</sub> 的 PBS 缓冲液 1 ml 和 5 μl 全血。Falcon 试验管中加入 Retic-COUNT 试剂 1 ml 和 5 μl 全血,充分混匀。室温暗处温育 30 min,4 h 内上机分析,分析前充分混匀上样管。

1.2.3 日内精密度 按美国临床实验室标准化委员会制定的方案<sup>[3]</sup>。随机将健康体检者分 5 组,每组 20 人;贫血患者分 2 组,每组 25 例。Ret 百分比按仪器初步测量结果,每份重复测定 10 次,并计算平均值( $\bar{x}$ )和变异系数(CV)。

1.2.4 日间精密度 因临床血液标本稳定性差,采集后置于 4℃ 冰箱,健康体检者及贫血患者分组同上。每天 9、12、16 时测定 3 次,取均值,连续测定 5 天,并计算  $\bar{x}$  和 CV。

[收稿日期] 2009-10-14

[作者单位] 江苏省连云港市第二人民医院 检验科,222023

[作者简介] 刘小林(1978-),女,检验师。

1.2.5 稳定性试验 因考虑温度为主要影响因素, 血样皆为低温保存。健康体检者和贫血患者分组同上。每份血液样本分为 3 管, 染色后避光放置于 4 ℃ 冰箱, 30 min、4、8、12、24、48 h 每个时间点测定 3 次, 取均值。

1.2.6 相关性评价 同时用流式细胞仪和手工计数 2 种方法做 Ret 计数平行试验, 按文献[4], 随机取 40 份标本各制作 3 张血片, 2 名有经验的主管技师随机各选一张, 双盲法计数 Ret 百分比, 取均值后与流式细胞仪测定结果进行相关性比较。

1.2.7 重复性试验 对其中 40 例血中 Ret 用 2 种方法进行 10 次重复性测定, 分别计数流式细胞术和手工法所得结果均值的 CV。

1.3 统计学方法 采用方差分析和直线相关与回归分析。

## 2 结果

2.1 日内精密度测试 流式细胞仪检测 Ret 百分比的日内精密度较好(见表 1)。

表 1 流式细胞仪检测 Ret 百分比测定日内精密度

样本组数	Ret (%)	CV
1	1.003	0.04
2	1.104	0.29
3	0.980	0.12
4	12.980	0.24
5	9.220	0.27

表 3 流式细胞仪检测 Ret (%) 稳定性比较 ( $n_i = 3; \bar{x} \pm s$ )

样本组数	30 min	4 h	8 h	12 h	24 h	48 h	F	P	MS <sub>组内</sub>
1	2.72 ± 0.23	2.75 ± 0.09	2.81 ± 1.10	2.86 ± 0.01	2.86 ± 0.12	2.94 ± 0.78	0.06	>0.05	0.316
2	1.15 ± 0.22	1.16 ± 0.17	1.26 ± 1.03	1.30 ± 1.28	1.47 ± 0.42	1.58 ± 0.57	0.16	>0.05	0.546
3	1.16 ± 0.54	1.17 ± 1.33	1.19 ± 1.29	1.44 ± 1.07	1.50 ± 1.29	1.58 ± 0.78	0.09	>0.05	1.190
4	12.05 ± 0.87	12.33 ± 1.48	12.37 ± 1.92	12.63 ± 1.37	12.66 ± 1.24	12.47 ± 0.27	0.09	>0.05	1.687
5	11.04 ± 0.19	11.21 ± 1.01	11.25 ± 0.55	11.40 ± 0.82	11.23 ± 0.77	11.58 ± 0.39	0.22	>0.05	0.463

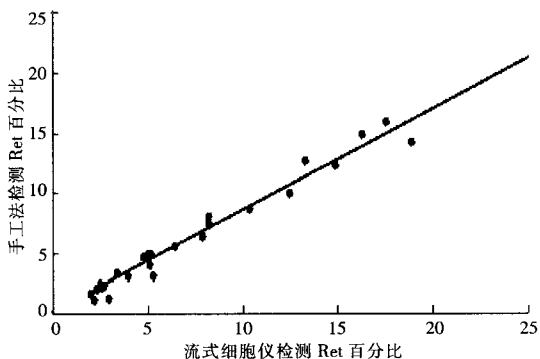


图 1 2 种方法测定结果

2.2 日间精密度测试 流式细胞仪检测 Ret 百分比的日间精密度较好(见表 2)。

表 2 流式细胞仪检测 Ret 百分比测定日间精密度

样本组数	Ret (%)	CV
1	1.003	0.15
2	1.104	0.09
3	1.800	0.26
4	13.790	0.36
5	15.800	0.27

2.3 稳定性 流式细胞仪检测 Ret 百分比的稳定性好, 差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ ) (见表 3)。

2.4 Ret 流式细胞仪测定与手工方法测定相关性评价 结果显示, 2 种方法测定结果呈正相关关系 ( $r = 0.9904, R^2 = 0.9809, P < 0.01$ ), 直线回归方程为  $\hat{Y} = 0.8704X - 0.2114$  (见图 1)。

2.5 重复性 对其中 40 例外周血中 Ret 百分比用 2 种方法进行 10 次重复性测定, 流式细胞术所得结果均值的 CV < 0.33%, 显著低于光镜计数法的 3.2%, 说明流式细胞术比光镜计数法具有更好的重复性。

## 3 讨论

流式细胞仪检测 Ret 百分比原理是: 噻唑橙可通过细胞膜特异性结合在 Ret DNA 和 RNA 上, 其结

合形成荧光细胞核试剂复合体, 在 475 nm 有吸收光, 在 530 nm 有荧光发出, 流式细胞仪在 488 nm 激光可准确收集该荧光。传统的手工检测 Ret 百分比繁琐而费时, 准确性受操作人员的经验、水平、细胞计数量、染色效果及涂片质量等因素影响大, 重复性差。随着流式细胞术的不断发展和应用, 逐渐弥补了手工方法的缺陷。

本研究结果表明, 结合流式细胞仪测定 Ret 具有如下优势: 有良好的日间和日内精密度, 其 CV < 0.36, 处于理想范围之内。稳定性测试表明, 随着血液样本放置时间的延长, 因为红细胞在不断进行新

陈代谢,细胞转化未完全停止,计数结果会略有上升,但不影响临床诊断。4℃ 48 h 内 Ret 百分比结果相对稳定,结果差异均无统计学意义( $P > 0.05$ ),显示稳定性较好。同期与手工法检测的百分比呈正相关关系。流式细胞术比光镜计数 Ret 的均值略偏高,因为一些 IV 期的 Ret 在光镜下辨认困难,而流式细胞术检测具有极高的灵敏度,对于发出较弱光的 IV 期 Ret 也可以探测到荧光信号。试验重复性好, CV 小,流式细胞仪分析速度可达到或大于 1 000 ~ 1 500 细胞/秒,检测和重复速度快,这与相关文献报道<sup>[5-7]</sup>是一致的。且仪器法检测细胞数可达 10 000,较手工方法检测数量多。同时流式细胞仪操作简单,使单细胞悬液检测具有很好的取样精确性,由于使用的是细胞悬液,可有效避免细胞在血片分布上的统计学误差,特别是低值测量结果,故流式细胞仪有高纯度等不可替代的优势。

相关研究<sup>[8]</sup>表明,流式细胞术是从 RNA 定量角度去计数 Ret,不仅可自动化计数,还可根据 RNA 含量的不同去揭示 Ret 发育过程中动力学的变化,根据 Ret RNA 含量的分布直方图,可直观地了解血中各期 Ret 的分布状态,因此仪器法应更为理想。

总体而言,流式细胞分析仪 Ret 百分比测定避免了传统手工法的诸多缺点,如肉眼判读的主观性、

细胞的分布误差、检测的低效率等,具有高速度、高灵敏度、高精度、高纯度、高细胞数量、高参数、信息量大、统计学精度高、重复性好等优点,且 Ret RNA 含量的分析与 Ret 计数相结合更能反映骨髓造血功能状态。因此,流式细胞术检测 Ret 百分比可作为更敏感的方法,用于临床各种贫血的诊断和疗效监测。

#### [参 考 文 献]

- [1] Miale J. Laboratory Medicine Hematology [M]. 5th ed. St Louis: CV Mosby Co. 1997.
- [2] 叶应妩,王毓三. 全国临床检验操作规程[M]. 2 版. 南京:东南大学出版社,1997:14.
- [3] Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures; A Statistical Approach; Approved Guideline. NCCLS document EP9 - A2, 2002.
- [4] Reference leukocyte differential count (Proportional) and evaluation of instrument methods, NCCLS document H20 - A, vol12, 1992.
- [5] 臧婉,吴丽娟. 流式细胞术网织红细胞分析及其在贫血性疾病诊疗中的初步应用[J]. 重庆医学, 2008, 37(3): 247 - 248, 251.
- [6] 许艳丽. 流式细胞仪检测网织红细胞百分率及网织红细胞成熟指数的意义探讨[J]. 检验医学与临床, 2006(5): 198 - 199.
- [7] 许艳丽,毛平. 流式细胞术同时检测网织红细胞与网织血小板[J]. 国外医学:临床生物化学与检验学分册, 2001, 22(5): 275 - 276.
- [8] 金江. 用流式细胞术检测小儿网织红细胞[J]. 河北医学, 1995, 17(2): 65 - 67.

[文章编号] 1000-2200(2010)08-0830-02

· 检验医学 ·

## 临床生化检验测量不确定度的评估

仲崇明,夏正萍

**[摘要]**目的:探讨测量不确定度在临床生化检验的应用。方法:使用 Beckman CX9 PRO 型生化分析仪及其配套试剂、质控品等,测定临床生化指标测量不确定度。结果:各指标测量不确定度总蛋白为 2.94,白蛋白为 7.22,γ-谷氨酰转氨酶为 14.3,天冬氨酸转氨酶为 11.71,丙氨酸氨基转移酶为 12.8,碱性磷酸酶为 8.22,Na<sup>+</sup> 为 1.34,K<sup>+</sup> 为 2.38,Cl<sup>-</sup> 为 2.65, Ca<sup>2+</sup> 为 4.17, P<sup>4+</sup> 为 4.00,尿素氮为 9.17,肌酐为 9.34,尿酸为 13.72,葡萄糖为 4.06,胆固醇为 3.87。结论:测量不确定度可反映检测结果的准确性及分散性,在临床应用中有重要价值。

**[关键词]** 临床生化检验;测量不确定度;标准差;百分变异系数

[中国图书资料分类号] R 446.1 [文献标识码] A

临床检验的主要任务就是对人体标本的各种特性进行赋值。所赋值的准确性、可靠性及其分散性都会直接影响到疾病的诊断、治疗方案的确立及疗效的观察。故保证、提高检验质量是检验医学的生命线<sup>[1]</sup>。现在多以测量不确定度(U%)来表示准确性。为反映本实验室检测质量,现参照相关测量不确定度的方法要求<sup>[2-3]</sup>,对本室 16 项生化检验项目

进行(U%)的评估。

### 1 材料与方 法

1.1 仪器及试剂 Beckman CX9 PRO 型生化分析仪及配套试剂;校准品、室内质控品、定值质控品均为 Beckman 产品。

1.2 检测程序 (1)保证仪器性能良好,正常校正,室内质控在控。(2)批内 CV:以 1 天内室内质控品 20 次测定结果计算;批间 CV:室内质控品每天测定 1 次,收集 20 次结果计算。(3)偏倚:以定值质

[收稿日期] 2009-10-16

[作者单位] 江苏省连云港市第二人民医院 检验科,222023

[作者简介] 仲崇明(1964-),男,副主任技师。