

免疫检测的临床评估

曾 蓉¹, 王治国^{2△}

(1. 北京协和医学院研究生院 100730; 2. 卫生部北京医院/卫生部临床检验中心 100730)

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.13.063

文献标识码: B

文章编号: 1673-4130(2011)13-1523-02

对于某种新的分析方法, 需采用比对或临床的方法对其进行评估。典型的比对评估用于实验室中不同厂商的不同分析法的更替。这种评估仅简单地将 2 种分析法进行比较, 而未考虑任何临床要求[参见美国临床和实验室标准化协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLIS)文件 EP09]^[1]。因而, 对临床性能的评估, 也即对其分辨疾病和非疾病状态的能力的评估, 在实验室计划采用新分析法或新分析物时是必要的^[2-3]。

1 分析性能的建立

本文重点在于免疫分析的临床评估, 但相关内容与方法也适用于其他检验专业。免疫分析中的关键特征包括以下方面。

1.1 分析成分 标准品、试剂及质控品的批号都应匹配, 以尽量减少结果变异性。不同来源的抗原、抗体, 都应提供适当的文件记录。在特定浓度区间制备的标准品应该涵盖整个测量范围, 包括关键的测量“决定性”浓度。

1.2 标本要求 在临床实验室中, 血清是免疫分析最常见的标本。应避免溶血、脂血、浑浊及其他问题。列出推荐的抗凝物。分析法开发者或厂商有义务说明储存标本的条件和时间, 包括反复冻融的耐受性。

1.3 实验设计标准 (1) 优化检测方法。首先确定反应条件、线性、分析特异性、检出限等。然后以分析物参考区间水平估计统计学决定水平和临界值。(2) 性能评估。CLSI 文件 EP05^[4]、EP06^[5]、EP09、I/LA23^[6] 和 EP14^[7] 对性能评估有详细描述。包括分析测量范围和临床决定水平的确认, 检测低限和高限的确定, 精密度的确认及参考测量程序的溯源性等内容。(3) 干扰研究和交叉反应性研究。常见的干扰物包括血红蛋白、脂类、胆红素等。由内源性抗体引起的干扰是免疫检测中分析变异的特殊来源。交叉反应性研究可确定分析法检测特定分析物的特异性^[6]。(4) 质量保证(quality assurance, QA)和质量控制(quality control, QC)。包括对质控物及其浓度的要求、建立 QA 标准、执行 QC 指南、QC 的解释及针对不符合 QC 结果的措施。(5) 培训。根据建议的复杂性确定培训强度和技术水平。

2 临床评估的计划和设计

2.1 研究者手册 该手册应为临床评估提供一系列清楚的参考指南, 并可以用于发起者与调查员的交流中。

2.2 伦理问题 每个评估研究者必须要获得伦理审核委员会, 又称机构审查委员会(Institutional Review Board, IRB)或独立伦理委员会(Independent Ethics Committee, IEC)的批准, 以确实保障受试对象的权利和安全^[7], 并将受试对象的风险降到最低。

2.3 预评估 预评估对于正确评估免疫分析法十分重要, 可以确定抗原抗体结合反应是否被各种因素影响而造成差异。同时可以通过预评估更好地确定评估的样本量。

2.4 评估性能特征 (1) 分析特征。在进行临床性能评估前,

需要先对分析法的分析性能特征进行评估。这种性能特征的验证可以确保一种检测的分析性能特征由不同地点的不同工作人员进行检测和解释的时候是可重复的。(2) 临床性能。评估临床性能的常见方法是确定灵敏度和特异性。灵敏度是通过检验患病或有临床终点的对象的样本而确定的, 而特异性是通过无病的可比人群的本来确定的。灵敏度和特异性因临界值的改变而不同。一般说来, 两者是此消彼长的。对于连续性变量, 受试者工作曲线(receiver operation curve, ROC)分析可以提供所有可能的临界值和相关的灵敏度和特异性^[8]。对于定性数据, 可采用类似表 1 的表格对试验结果进行说明, 并可用于表示和比较每个试验的临床性能。(3) 无论是评估一种方法或是比较多种方法的灵敏度, 样本都应该能够代表目标人群, 且样本量足够大。患者样本、参考样本和能力验证(proficiency testing, PT)样本都可用于研究分析可比性。但是, 有些 PT 样本可能因基质干扰导致错误结论。(4) 参考样本。每个参考样本的值已设定好, 并可溯源到参考方法或临床诊断; 包括一套用于验证的阳性和阴性样本。但参考样本可能代表了临床人群或典型的患病率和疾病谱。(5) 盲法。应用盲法可以防止因为知道正在评估的样本的结果而可能引入的评估者偏倚。这种偏倚会影响结果测量的准确性^[9]。(6) 统计效能和样本量。以统计学方法确定临床评估的样本量、评估人群和统计学方法的选择。样本量足够大时才能提供可靠的 ROC 图。(7) ROC 曲线和方差分析。ROC 曲线已成为描述和比较诊断性试验准确性的标准; Y 轴为真阳性率(灵敏度), X 轴为假阳性率(非特异性); 可用于灵敏度和特异性的综合评估。ROC 图还可用于确定某个检验的特定临床应用的临界值^[9]。方差分析(analysis of variance, ANOVA)可以确定分析内变异、分析间变异和研究人群的生物学变异的整体变异分布。(8) 对象的分类。尽可能确定每个对象的真正健康状态, 这是临床评估的基础。不同的检验设备间可能发生分类的差异。差异的频率可以用与表 2 类似的表格进行描述(其中 B 和 C 有差异)。注意: 结果差异会随临界值的改变而改变。

表 1 定性数据的四格表

试验结果	实验对象	
	感染	未感染
阳性	A	B
阴性	C	D

3 临床评估的执行

3.1 监测临床评估 评估发起者应选择合格且经验丰富的监督员, 以确保研究对象的安全、权利、福利和评估数据的质量, 同时确保其遵守评估草案。

3.2 数据库管理 发起者负责设计、核实和维持数据库管理系统。数据库管理系统必须能确保数据准确性和可靠性。监

△ 通讯作者, E-mail: zhiguo_w@hotmail.com.

督员应准确记录数据审核和工作人员的依从性。数据审核通过评估人群的采样来完成。

表 2 差异频率的四格表

检验 1 的结果数	检验 2 的结果数	
	阳性	阴性
阳性	A	B
阴性	C	D

3.3 记录保存 临床评估数据的保存应该采用国家规定的方法。数据保存的时间开始于这种分析法用于实践时。记录应该保存在容易获得的地方,以方便调查人员审核。

4 数据分析

分析的目的在于确定所获得的数据是否真正展示了分析法的性能和研究的目的。

4.1 统计检验 (1)定量数据。采用 ROC 分析以评估定量数据,包括比对、重复性评估等。每个检验都应具备完整的假阳性百分数与真阳性百分数及其置信区间,同时获得曲线下面积(area under curve, AUC)及其置信区间。确定经 ROC 和 AUC 分析获得的差异的意义。(2)半定量数据。对于结果等级较多的半定量数据,可以采用 ROC 分析来评估结果和比对检验。(3)定性数据。如前所述,定性数据最好采用四格表的方式来表示,对不同检验方法的阳性或阴性检验结果进行比较。在某些情况下,可能采用两种参考来进行更为精确的比对,这两种参考相结合的有效性提供了更高的临床准确性。如果阳性或阴性结果取决于与预先设定的临界值相比较的测量信号,那么 ROC 分析可能很合适。

4.2 性能特征的记录 理想的免疫分析法的临床评估主要是用于计算待评估分析法的性能特征数据。这些特征代表了当检验人群与评估人群相似时预期的性能。在描述免疫分析法性能特征时,应该呈现重复性和总体重现性。推荐采用表格形

式描述数据。

4.3 临床评估总结 临床评估总结形式取决于评估的目的。临床评估总结可用于监管意见书、文献发表、临床实验室报告,也可包括在产品说明书中。

参考文献

[1] Clinical and Laboratory Standards Institute. EP09-2. Method comparison and bias estimation using patient samples; approved guideline-second edition[S]. Wayne, PA: CLSI, 2002.

[2] 黄波, 廖常责. 乙肝两对半两种检测方法的比较[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(2): 165-167.

[3] 马永能, 张鹏, 刘慧玲. 不同发光检测系统总前列腺抗原测定结果的对比研究[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(6): 544-545.

[4] Clinical and Laboratory Standards Institute. EP05-A2. Evaluation of precision performance of quantitative measurement methods; approved guideline-second edition[S]. Wayne, PA: CLSI, 2004.

[5] Clinical and Laboratory Standards Institute. EP06-A. Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures; approved guideline-second edition[S]. Wayne, PA: CLSI, 2003.

[6] Clinical and Laboratory Standards Institute. I/LA18-A2. Specifications for immunological testing for infectious disease; approved guideline-second edition[S]. Wayne, PA: CLSI, 2001.

[7] Clinical and Laboratory Standards Institute. EP14-A2. Evaluation of matrix effects; approved guideline-second edition[S]. Wayne, PA: CLSI, 2005.

[8] 何惠, 刘基铎, 周迎春, 等. ROC 曲线评价 AFU 及 AFP 对原发性肝癌的诊断价值[J]. 国际检验医学杂志, 2006, 27(2): 118-120.

[9] 沙玲, 曹研, 施莉. 应用 ROC 曲线对肿瘤标志物 CA153、CA125、CEA 和 AFP 在乳腺肿瘤早期诊断中的应用价值评价[J]. 国际检验医学杂志, 2007, 28(11): 1039-1040.

(收稿日期: 2010-11-16)

(上接第 1522 页)

常规检查示 PLT 减少, 于本科室行血常规检查示 PLT $49 \times 10^9/L$, WBC 直方图与 Y 轴相截, 提示存在 35 fl 以下的颗粒干扰, 红细胞直方图轻度右移; 血涂片染色镜检见 PLT 明显聚集成堆; 改用枸橼酸钠抗凝剂再次采血后检测示各参数及直方图基本正常; 临床诊断为假性血小板减少。

2 讨论

电阻型血细胞分析仪是以 Coulter 原理为基础, 对血液中的 Hb 浓度和 WBC、RBC、PLT 的数量、体积进行精确测量的半自动检测仪^[1]。在直方图上, 按溶血剂处理后的细胞体积大小将 WBC 分为: 淋巴细胞(35~90 fl)、中间细胞(90~160 fl)和粒细胞(160~450 fl); MCV 参考值一般为 90 fl, 血小板体积分布范围参考值为 2~20 fl; 根据正常 WBC 体积分布规律, 在峰谷处(35、90、160 和 450 fl)设置报警信号, 若峰谷发生漂移或消失均可报警为 WBC 异常^[2-4]。直方图异常区域在淋巴细胞左侧时, 提示有体积小于 35 fl 的颗粒干扰, 如聚集的 PLT 或巨血小板、有核红细胞(nucleated red blood cell, NRBC)、未溶解 RBC、脂类颗粒、冷凝球蛋白、疟原虫等; 在淋巴细胞和中间细胞区域时, 提示存在异型淋巴细胞、原始细胞、浆细胞、嗜酸或嗜碱细胞; 在中间细胞和粒细胞区域, 提示有未成熟粒细胞、异常细胞; 在中性粒细胞右侧区域时, 提示中性粒细胞绝对

数增高。不同类型血细胞分析仪的原理、参数有所不同, 其临床应用也有差异^[5-6]。因此有必要掌握常用血液分析仪的原理及主要分析参数和直方图的临床意义, 尤其是不同疾病患者血细胞分析的图形、数据变化特征, 一旦发现检测数据或直方图有异常改变, 必须进行显微镜计数和形态学检查, 使血细胞分析仪在对临床疾病的筛查、诊断、治疗中发挥其应有的作用。

参考文献

[1] 徐廷云. 三分群 COULTER 血细胞分析仪检测血小板的影响因素[J]. 临床医学工程, 2010, 17(11): 27-28.

[2] 李玉英, 王丽伟, 曲金荣. 血细胞分析仪红细胞体积分布直方图的临床意义[J]. 中国医药指南, 2010, 8(33): 219-220.

[3] 左艳君, 杨冉, 李捷. 白细胞直方图在血液病检测中的应用分析[J]. 社区医学杂志, 2009, 7(15): 79-80.

[4] 达娃卓玛. 电阻抗法血细胞分析仪血小板计数及血小板直方图的影响因素分析[J]. 西藏医药杂志, 2009, 30(1): 27-29.

[5] 董家书. 对不同血细胞分析仪的比对试验[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(1): 92-93.

[6] 葛亮, 季明德, 陈云峰, 等. 不同血细胞分析仪结果比较[J]. 国际检验医学杂志, 2008, 29(12): 1142-1143.

(收稿日期: 2011-05-05)