

应体系中加入磷酸吡哆醛,作为 ALT 的辅基,磷酸吡哆醛可增强 ALT 的活性,所以理论上,同一标本的 ALT 测定,强生 350 的结果要高于奥林巴斯 AU2700,此次比对结果也印证了这一点。但随着 ALT 的升高,干、湿化学的差别逐渐减少,相对偏倚由湿化学 20 U/L 时的 45% 逐渐减少到湿化学 300 U/L 时的 2.3%,究其原因,在于试剂中的磷酸吡哆醛含量是固定的,随着标本中 ALT 浓度的升高,磷酸吡哆醛对 ALT 活性的相对增强作用减少。

在湿化学结果为 40~50 U/L 左右的标本,干化学与之偏倚临床不可接受,但这种相对偏倚的程度相对于两者所推荐参考值的相对偏倚却较小,因为如果按照干生化所推荐参考值,湿化学测定结果在 40~50 U/L 左右的标本,其结果为阳性,干化学检测结果因为低于推荐参考值 13~59 U/L 反而为阴性。湿化学 ALT 参考值为 0~40 U/L 已被广泛认可,而强生所推荐 ALT 参考值 13~59 U/L 是对美国 2 444 位外观健康的成人所进行的内部研究结果的 95% 中间值,其范围是否符合中国人群很值得商榷,所以,建立真正适合中国人群乃至具体到各实验室的干化学的参考范围是当务之急。

随着检验医学的不断发展,干化学和湿化学一样已得到广泛的应用,因其便捷,尤其适合急诊生化检验,也因此同一项目干、湿化学检验结果及参考区间统一性的问题格外重要。李贵星等^[8]提出的解决方法有 3 种:(1)对于不同的分析仪器或不同的分析方法,制订相应的参考值范围;(2)将某一台仪器作为参考标准,其他分析仪向它靠拢;(3)标准化方法。第 1 种方法需实验室在干、湿化学分析仪各自检验报告上特别注明参考范围的不同,给予临床警示作用。吴俊琪等^[9]、陈阵^[10]采用第 2 种方法,即将湿化学仪和干化学仪测定结果进行比对及相关回归分析,并将各项目直线回归方程的斜率、截距作为仪器的校正参数,输入干化学仪中,达到结果的一致性。

综上所述,无论采用哪种方法,ALT 湿化学结果为 40~50 U/L 左右的标本,如果多次在干、湿化学分析仪分别检测的

• 检验技术与方法 •

话,其结果相对于参考范围的差别会给临床医生对疾病的诊断及治疗效果观察带来困难。因为磷酸吡哆醛作为 ALT 的辅基,由于其对 ALT 活性的相对增强作用,同一实验室为保证 ALT 干、湿化学结果的临床可比性,干、湿化学 ALT 测定必须定期作比对,校正其偏差,同时制定真正适合国人甚至本地区的 ALT 干化学参考范围。

参考文献

[1] The National Committee for Clinical Laboratory Standards. EP9-A Method comparison and bias estimation using patient samples approved guideline[S]. Wayne,PA:NCCLS,1995.

[2] Centers for Disease Control and Prevention. CLIA' 88 Clinical Laboratory Improvement Amendment 88 [EB/OL]. [1990-03-14]. <http://wwwn.cdc.gov/clia/regs/toc.aspx>.

[3] 张传宝,张克坚.方法比对及偏差评估的方法——介绍 NCCLS 文件 EP9-A[J].江西医学检验杂志,2000,18(2):108-109,83.

[4] 张秀明,庄俊华,徐宁,等.不同检验系统 4 种心肌酶测定结果的比对与临床可接受性评价[J].临床检验杂志,2005,23(6):404.

[5] 罗洵阳,张劼,孙兵,等.2 台日立 7600 生化分析仪 6 种血清酶测定结果可比性评价[J].临床检验杂志,2007,25(4):297.

[6] 梁瑞莲,周远青,谢丽明,等.同室不同生化检测系统测定结果的比对和偏倚评估[J].检验医学与临床,2009,6(14):1159-1162.

[7] 许静,王伟祥,金慧萍,等.干、湿生化分析仪部分测定值的比分析和偏倚评估[J].检验医学与临床,2010,25(3):207-209.

[8] 李贵星,陆小军,高宝秀.临床生化干化学分析和湿化学分析的初步比较[J].华西医学,2003,18(1):69-70.

[9] 吴俊琪,徐瑞龙,杜忠明,等.VITROS-250 干式生化分析仪测定结果的比对校正[J].检验医学,2006,21(3):285-287.

[10] 陈阵. VITROS9250 干化学分析仪测定结果的回归校正[J].大连医科大学学报,2000,22(4):4-5.

(收稿日期:2011-03-09)

乳胶增强散射比浊法检测 CRP 分析性能验证与评价

吴元健

(南京医科大学附属苏州市立医院检验科,江苏 215002)

摘要:**目的** 评价西门子 BNⅡ全自动特定蛋白分析仪检测 C 反应蛋白(CRP)的分析性能。**方法** 参考美国临床实验室标准化协会(CLSI)文件以及其他相关文献并结合实际工作,对西门子 BNⅡ全自动特定蛋白分析仪采用乳胶增强散射比浊法检测 CRP 的精密度、准确度、临床可报告范围、参考区间等性能进行验证,并与公认的质量标准或厂商声明的性能进行比较。**结果** 精密度均符合西门子试剂说明书的性能要求;对卫生部临床检验中心发放的 10 份室间质控品检测结果与靶值的相对偏倚(SE%)在一4.34~10.41 之间;回收率为 98.71%~104.39%,在 90%~110%的可接受范围内;CRP 的稀释回收率均在 80%~120%可接受范围内;参考区间验证结果均在实验室给出的参考区间内。**结论** 西门子 BNⅡ全自动特定蛋白分析仪采用乳胶增强散射比浊法检测 CRP 的分析性能符合质量目标要求。

关键词: C 反应蛋白质; 评价研究; 分析性能; 验证

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.20.042

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)20-2388-03

为确保临床实验室检验结果的准确与可靠,《医疗机构临床实验室管理办法》要求对检测系统进行有效性评价。ISO15189《医学实验室质量和能力的专用要求》也要求参加其认可的实验室,应对设备、检测系统或方法的分析性能进行验证,证实其能够达到临床检测要求的标准^[1]。本研究参考美国临床实验室标准化协会(CLSI)文件以及其他相关文献并结合

实际工作,对西门子 BNⅡ全自动特定蛋白分析仪采用乳胶增强散射比浊法检测 C 反应蛋白(C-reactive protein,CRP)的分析性能进行验证与评价。

1 材料与方法

1.1 材料 西门子 BNⅡ全自动特定蛋白分析仪及配套的超

敏 CRP(high-sensitive C-reactive protein, hs-CRP)试剂(批号: 167898)、辅助试剂(批号:115396)和稀释液(批号:11261410),校准品(溯源于 CRM470,批号:183855)浓度为 21.8mg/L, RANDOX 低值质控品(批号:150LPC)、高值质控品(批号:166LPC)。

1.2 标本 来源于本院就诊患者或正常健康体检者,要求为新鲜血清,无溶血、黄疸、脂血,于-20℃条件下保存。

1.3 方法

1.3.1 精密度验证实验 参照 CLSI EP5-A2 评价方案^[2],用低、高 2 个水平的质控品进行精密度验证试验,每个浓度每天测定 2 次(间隔时间大于 2 h),每次重复测定 2 次,共测定 20 d,进行批内精密度和室内精密度性能验证。

1.3.2 准确度验证实验 参照 CLSI EP15-A2 文件^[3],对卫生部临床检验中心 2010 年 2 次发放的 10 个不同批号室间质控品进行检测,计算相对偏倚(SE%), $SE\% = [(测定值 - 靶值) / 靶值] \times 100\%$,若 SE%绝对值小于或等于 1/2CLIA'88 允许总误差(TEa),即 $-12.5\% \leq SE\% \leq 12.5\%$ 为可接受。

1.3.3 回收实验 将浓度为 87.49、174.96、350.03 mg/L 的 3 个样品及 0.9%NaCl 溶液分别加入低浓度 CRP 血清样本中(1:9,V/V),混匀后重复检测 2 次,取其均值计算回收率。公式为: $P = (X_i - X_0) / M \times 100\%$,其中 P 为回收率,X_i 为混合样本的检测平均值,X₀ 为基础样本浓度,M 为添加的标准液浓度。回收率在 90%~110%,结果为可接受^[4]。

1.3.4 临床可报告范围(Clinical Reportable Range,CRR)验证实验 CRR 是定量检测项目向临床所能报告的结果范围,患者标本可经稀释、浓缩或其他处理^[5]。根据西门子 BN II 全自动特定蛋白分析仪的特点,选择不同的检测档位,进行稀释回收实验,首先选择 3 份高浓度样本,原样本选择 40 000 档位检测,3 份高浓度样本的 CRP 浓度分别为 357.61、380.36、479.52 mg/L,再用稀释液作 5、10、20、50、100、200 倍稀释,分别选择不同的检测档位检测,稀释回收率=(实测值/预期值)×100%。回收率在 80%~120%,结果为可接受,从而确定标本稀释的最大倍数^[4],再结合不同检测档位的测量范围,确定 CRR。

1.3.5 参考区间验证实验 本实验室直接采用《全国临床检验操作规程(第 3 版)》提供的参考区间^[6],参照 CLSI C28-A2 评价方案^[7],留取肝、肾功能及白细胞检查正常的健康查体者标本,于-20℃条件下保存,在 24 h 内同时复融检测,用 20 个参考个体数据对其进行验证。如有 2 个以下参考个体数据在参考区间外,则该区间为可接受。

1.4 统计学处理 用 Microsoft Office Excel 2003 软件分析。

2 结 果

2.1 精密度实验结果 检测均数为 21.67、61.57 mg/L 低、高 2 个水平的质控品,根据 CLSI EP5-A2 评价方案的统计方法进行分析后显示,所计算得的 χ^2 值均小于相应自由度(R)的 95%上限临界值(表 1),说明批内精密度和室内精密度 2 项评价参数和西门子试剂说明书的性能要求无显著性差异,该精密度可接受。

2.2 准确度实验结果 计算 10 个不同批号室间质控品的 SE%在-4.34~10.41 之间,均在可接受范围之内。

2.3 回收试验结果 经计算 3 个样品回收率分别为 102.41%、98.71%、104.39%,结果显示回收率均在 90%~110%的可接受范围内。

2.4 CRR 验证实验结果 当样本稀释度为 5~200 倍稀释

时,稀释回收率均在 80%~120%可接受范围内,结果见表 2。

表 1 批内精密度和室内精密度性能验证结果

项目	批内精密度		室内精密度	
	低值质控品	高值质控品	低值质控品	高值质控品
R 值	40	40	40	50
χ^2 值	13.05	15.21	23.53	54.02
相应 R 的 95%上限临界值	55.80	55.80	55.80	67.50

表 2 CRP 稀释回收实验结果

稀释倍数	样本 1(%)	样本 2(%)	样本 3(%)	检测档位
5	100.71	101.37	100.42	8 000
10	102.40	99.85	100.83	2 000
20	103.01	104.58	95.97	400
50	98.01	102.66	97.07	100
100	97.31	98.33	101.56	20
200	102.90	97.80	102.18	5

2.5 参考区间验证实验结果 由于 CRP 在健康人群中为左偏态分布^[8],因此计算时采用百分位数,用 20 个参考个体数据验证结果的中位数为 0.63 mg/L,2.5%~97.5%范围为 0.15~6.85 mg/L,且均在直接转移的参考区间 0.068~8.200 mg/L 内。

3 讨 论

CRP 是在炎症或组织损伤的情况下的非特异性标志物,并能视为急性反应时相蛋白之一。在炎性疾病、组织损伤、恶性肿瘤、手术创伤、组织坏死等情况下数小时内迅速升高,在 24~72 h 可达高峰,可超过正常水平的 10~1 000 倍,病变消退后立即下降至正常^[9]。CRP 较其他时相蛋白增长快而显著,且此升高的幅度与感染的程度呈正相关。

研究表明,通过超敏分析测量 hs-CRP 是预测未来患心血管疾病和周围血管疾病危险的一个独立预测指标,而且还是首次发生心血管疾病危险性非常有效的预测指标,hs-CRP 高值人群发生心肌梗死的危险性是低值人群的 2 倍^[10],同时,hs-CRP 也是脑梗死发生的重要影响因素之一^[11]。因此,及时准确的检测不同水平 CRP 对相关疾病的早期诊断和治疗有重要意义。

西门子 BN II 全自动特定蛋白分析仪采用乳胶增强散射比浊法检测 CRP 为配套检测系统(即封闭系统),实验室只需对精密度、准确度 CRR、参考区间 4 项基本的性能进行验证^[4-5]。

精密度是反映检测系统整体性能的首要指标,良好的重复性是进行其他方法学验证实验的前提。根据 EP5-A2 评价方案的实验结果确认,西门子的检测系统精密度可接受。在此基础上进行准确度验证实验,准确度评估一般可采用与参考方法比较、应用参考物质、回收实验等方式进行。本研究们通过检测卫生部能力验证样品计算 SE%和回收实验两种方法,验证结果显示 SE%与回收率均在可接受范围内,表明 CRP 的准确度符合临床要求。

对于多点定标的检测项目无需进行分析测量范围(AMR,即线性检测范围)的验证实验,此时该系统的测量范围由定标品定值范围决定^[5]。CRR 实验结果表明,CRP 在 357.61、380.35、479.52mg/L 浓度的稀释回收率为 95.97%~

104.58%,均在 80%~120%可接受范围内,完全可满足 hs-CRP 与 CRP 检测的临床需求。

参考区间是指一群健康人针对特定项目的检测结果的可信区间。若实验室采用厂家或出版物提供的参考区间,须对其进行验证确认。CLSI C28-A2 提供了 3 种参考区间的确认方案,审查与评估最初建立参考区间过程所分析的影响因子、由于 CRP 为常规生化项目,《全国临床检验操作规程(第 3 版)》提供了最新的参考区间,因此选用 20 个参考个体数据的方法对其进行验证,结果显示,参考区间 0.068~8.200 mg/L 符合临床要求。

综上所述,西门子 BNⅡ全自动特定蛋白分析仪采用乳胶增强散射比浊法检测 CRP 的主要分析性能验证结果符合质量目标要求。对检测系统的性能进行有效地评估和监测,有助于提高检测结果的准确性和可靠性。国内检测系统种类繁多且自建系统较多,更应系统和合理地选择、设计定量检测项目的性能验证实验方案。

参考文献

[1] 中国合格评定国家认可委员. ISO15189 医学实验室质量和能力认可准则[R]. 2006-06-01.
[2] Clinical and Laboratory Standards Institute. EP5-A2 Evaluation of precision performance of quantitative measurement methods[S]. Wayne,PA: CLSI,2004.

• 检验技术与方法 •

[3] Clinical and Laboratory Standards Institute. EP15-A2 User demonstration of performance for precision and accuracy[S]. Wayne, PA: CLSI,2004.
[4] 张葵. 定量检测系统方法学性能验证实验的基本方法[J]. 临床检验杂志,2009,27(5):321-323.
[5] 毕波,吕元. 定量检测系统方法学性能验证实验的系统设计[J]. 中华检验医学杂志,2007,30(2):143-145.
[6] 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,2006:591.
[7] Clinical and Laboratory Standards Institute. C28-A2: How to define and determine reference intervals in the clinical laboratory[S]. Wayne, PA: CLSI,2000.
[8] Charuruks N,Laohajinda B,Rujiwanitgun S,et al. Reference value for C-reactive protein and its distribution pattern in Thai Adults [J]. Cire J,2005,69(3):339-344.
[9] Tomoda H,Aoki N. Prognostic value of C-reactive protein levels within six hours after the onset of acute myocardial infarction[J]. Am Heart J,2000,140(2):324-328.
[10] 程红革. 超敏 C 反应蛋白与心血管疾病的预防[J]. 国际检验医学杂志,2010,31(11):1291-1293.
[11] 连连. 血清同型半胱氨酸和超敏 C 反应蛋白与脑梗死关系的探讨[J]. 国际检验医学杂志,2010,31(11):1315-1316.

(收稿日期:2011-03-09)

细菌鞭毛染色法的改良研究

梁 莹,邓毛子

(咸宁学院基础医学院病原实验室,湖北 437100)

摘 要:目的 探讨简便的细菌鞭毛染色法。方法 对细菌的鞭毛染色法在染液浓度、温度、时间上进行了调整。结果 镜检细菌菌体呈深红色,鞭毛呈浅红色,背景清晰。**结论** 该染色方法更加简便,染色结果耗时更短,效果良好。

关键词:研究; 细菌鞭毛染色; 改良研究

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.20.043 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2011)20-2390-02

细菌的鞭毛直径非常纤细仅有 10~30 nm,需要用电子显微镜才能观察^[1],或经 Leifson 法^[2]、Gray 法^[2]、镀银法^[3]、Ryu 法^[4]等方法染色,使鞭毛增粗后才能在普通光学显微镜下观察到。在这些特殊染色过程中又受许多因素影响。本实验研究细菌的鞭毛染色,在染液浓度、温度、时间上都作了改变,进行了调整,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 变形杆菌(来源华中科技大学同济医学院微生物学教研室),营养琼脂(生化试剂 BR,购自北京奥博星生物技术有限责任公司),普通肉汤培养基(由本室提供),DHP-9082D 电热恒温培养箱两台(购于上海申贤恒温设备厂),一台调至 37℃,另一台调至 50℃,普通光学显微镜(购于重庆光电仪器有限公司),钾明矾[KAL(SO4)₂,H₂O 化学试剂 CR,购自北京化工厂],鞣酸(C₇₆H₅₂O₄₆ 化学试剂 CR 来源于天津市恒兴化学试剂制造有限公司),苯酚(C₆H₆O 化学试剂 CR 来源武汉市江北化学试剂厂),碱性复红乙醇饱和液(碱性品红 1 g+95%乙醇 100 mL),碱性品红(生化试剂 CR,购自上海化学试剂公司)。

1.2 试验菌 变形杆菌经普通肉汤培养基培养 18 h 复活,点

种普通营养琼脂培养基平皿培养 16 h,传代 5 次(以增强细菌的运动力)^[5],备用。

1.3 玻片脱脂处理^[6] 将载玻片一片一片放入 1%清洁液中浸泡 30 min,以热水冲洗数次,彻底洗净、晾干、备用。

1.4 染液的配制 (1)传统染液的配制^[7]:20%钾明矾饱和液 20 mL,20%鞣酸溶液 20 mL,5%苯酚溶液 20 mL,碱性复红乙醇饱和液 15 mL。将钾明矾饱和液和鞣酸溶液混匀加热,一边振摇,一边缓慢地将碱性复红乙醇饱和液滴进去,直到完全溶解、过滤、备用。(2)改良染液的配制:钾明矾 1 g,鞣酸 4 g,苯酚 2 mL 加入蒸馏水 80 mL,隔水加热,待完全融化后,再加入碱性复红乙醇饱和液 10 mL 混匀,过滤,放入 40~50℃的热水中保温待染色用(防止染液结晶),备用。

1.5 方法 取第 5 代变形杆菌普通营养琼脂培养物周边菌苔,放入 1 mL 无菌蒸馏水中,浓度约 1.5×10¹²/L^[8](麦氏比浊法)^[9],轻轻摇匀,置 37℃恒温培养箱 8 min 取出,用毛细吸管吸取菌液放入脱脂处理过的载玻片上马上回吸(仅仅在玻片上看到有菌液的湿影即可),将带有菌液的玻片迅速放入 50℃的恒温培养箱内 5~8 min 干燥,取出进行染色,滴加传统染液保持 1 min,滴加 40~50℃改良染液保持 30~40 s,快速小水