

• 质控与标规 •

结核感染 T 细胞斑点实验中两种细胞计数方法的对比分析

张丽丽,杨慧娟,于嘉屏[△]
(上海迪安医学检验所 200433)

摘要:目的 通过比较人工计数法和 SYSMEX K-4500 自动血细胞分析仪在结核感染 T 细胞斑点实验(T-SPOT-TB)中对提取出的外周血单个核细胞悬液计数结果,探讨 SYSMEX K-4500 自动血细胞分析仪计数是否可用于 T-SPOT-TB 检验中。方法 采用随机、对照、开放性实验设计,对 T-SPOT-TB 实验中外周血单个核细胞悬液分别用显微镜人工计数和 SYSMEX K-4500 血细胞分析仪计数 WBC,数据用线性回归和配对 *t* 检验方法进行分析。结果 两种方法回归方程 $Y=0.994\ 4X+0.023\ 7$, $r=0.998\ 8$,两者结果符合性较好。结论 SYSMEX K-4500 血细胞分析仪计数可取代人工显微镜计数法用于 T-SPOT-TB 实验中对细胞悬液的计数。

关键词:结核感染 T 细胞免疫斑点实验; 血细胞分析仪计数; 比对分析
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.13.044 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2012)13-1638-02

结核感染 T 细胞免疫斑点实验(T-SPOT-TB)是一种快速辅助诊断结核分枝杆菌感染的一种方法^[1-2]。在 T-SPOT-TB 操作过程中,要对外周血单个核细胞(PBMC)培养液——AIM-V 悬液进行计数和用 AIM-V 稀释,使 PBMC 悬液配制成终浓度为 250 000 个/100 μ L 稀释细胞工作液,最终达到微孔板加样每孔 100 μ L,含 250 000 个 PBMC。细胞培养液常用计数盘手工计数细胞数,但操作繁杂,且不易准确^[3-4]。血细胞分析仪计数具有方便、快速、重复性好等优点,能自动计数血液白细胞。由于细胞计数对于决定植入的细胞浓度和数量以及了解细胞存活率都非常重要,本研究试图用 SYSMEX K-4500 血细胞分析仪自动计数培养液中的 PBMC,并与人工计数法进行比对,来探讨用血细胞分析仪计数培养液的细胞数对实验结果是否有影响。

1 材料与方法

1.1 材料 患者 4 h 内新鲜静脉血样本用肝素锂抗凝。
1.2 仪器与试剂 SYSMEX K-4500 血细胞分析仪、OLYMPUS 显微镜、低温离心机、血细胞计数池(经校正多次重复测定其 CV 值小于 1%)、BD 单个核细胞分离管(复星医学诊断公司提供);结核菌感染 ELISPOT 检测试剂盒 T-SPOT-TB(英国 Oxford Immunotec Ltd)、细胞培养液 AIM-V、0.4% 台盼蓝。

1.3 方法

1.3.1 实验方法 取患者 4 h 内新鲜静脉血样本 8 mL,按照 T-SPOT-TB 指南操作,按规定步骤完成 PBMC 提取,准备 PBMC AIM-V 悬液,每毫升正常外周静脉血大约可提取 $(1\sim2)\times10^6$ 单个核细胞,淋巴细胞占 60%~70%,单核细胞和巨噬细胞占 40%^[5],因每份标本细胞悬液有限,先用自动细胞分析仪计数,选取计数覆盖高、中、低值细胞悬液,最低 2.5×10^8 /L,取每日白细胞计数最高细胞悬液,每日选 8 份,8 h 内完成比对,共持续 5 d,40 份样本^[6]。每份样本悬液分别用 SYSMEX K-4500 血细胞分析仪和手工计数白细胞,每种方法各计数两次,取均值。人工计数由一名有经验检验人员来完成,先用 0.4% 台盼蓝将细胞悬液作 1:5 稀释后取 10 μ L 充计数池,显微镜下计数 4 个大方格的白细胞数,按公式计算每升细胞悬液的白细胞数,计算公式为:白细胞数/L=(4 个大方格的白细胞数/4) $\times$ 稀释倍数 $\times10^7$ 。

1.3.2 质控方法 SYSMEX K-4500 血细胞分析仪用上海市临床检验中心提供的质控品进行日常室内质控,结果均在控。

1.4 统计学处理 所有结果均采用样本配对 *t* 检验和线性回归的统计学方法进行分析。

2 结果

2.1 两种方法计数结果 40 份样本分别用人工计数法和自动血细胞分析仪计数,结果为:人工法($\bar{x}\pm s$)=11.35 $\pm$ 6.16; K-4500 计数($\bar{x}\pm s$)=11.31 $\pm$ 6.14。

2.2 离群点检验 经方法内离群点检验,各方法内重复测定值无离群点表现。

2.3 回归方程与相关系数 $Y=0.994\ 5X+0.024\ 2$,相关系数 $r=0.998\ 8$ 。

2.4 配对 *t* 检验 $t=0.868\ 1$, $P>0.05$ 。两法测定结果在统计学上差异无统计学意义。

2.5 散点图 从两种方法所测结果散点图可知,两法结果符合性较好,见图 1、2。

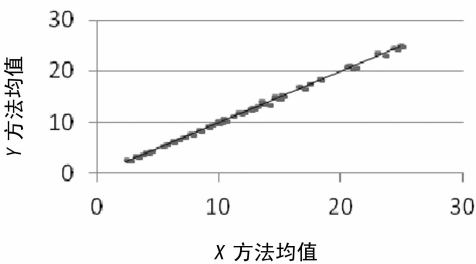


图 1 每个样品的 X 和 Y 方法均值比较散点图

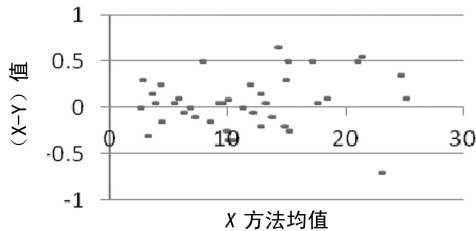


图 2 X 方法均值和(X-Y)散点图

3 讨论

T-SPOT-TB 是利用结核杆菌感染者 PBMC 中存在结核

[△] 通讯作者, E-mail: yujp60@163. com。

特异性 T 细胞,在受到结核杆菌特异抗原 A 和 B(ESAT-6, CFP-10)刺激后分泌 γ -干扰素($\text{IFN-}\gamma$),从而被微孔板上包被的 $\text{IFN-}\gamma$ 抗体捕获,经酶标志和显色后,每个 $\text{IFN-}\gamma$ 分泌细胞形成一个不溶性色素沉淀斑点,根据斑点数,推测体内是否存在结核杆菌特异性 T 细胞。通常阴性对照没有或仅有很少斑点。阳性结果说明患者体内存在针对结核杆菌的效应 T 淋巴细胞,阴性结果提示患者可能不含针对结核杆菌的效应 T 淋巴细胞,从而对结核杆菌感染进行辅助诊断^[7-8]。T-SPOT-TB 是目前最敏感的检测抗原特异性 T 细胞的方法之一^[9-10]。

李峤珂和吴雪琼^[11]对结核感染组和非结核感染组用 T-SPOT-TB 检测:每 2.5×10^5 个 PBMC,阳性结果抗原 A 孔斑点为 (27 ± 12) ,阳性结果抗原 B 孔斑点数为 (35 ± 1) ,阴性对照斑点 (2 ± 2) ,阴性抗原 A 孔 (4 ± 3) ,阴性抗原 B 孔斑点 (3 ± 2) 。阳性孔和阴性孔斑点数差异很大,易于判断。两种计数方法因为符合性很好,所以不会对结果产生影响。对于检测结果不可判断(灰区)的情况是非常罕见的,可能是由于淋巴细胞没有分泌 γ 干扰素。对于灰区 $(5 \sim 7)$ 个斑点,大概 5 万个细胞才有一个产生 γ 干扰素的 T 细胞,血细胞分析仪计数和人工计数没有那么大差异,所以也不会对结果产生影响。

SYSMEX K-4500 操作简便,效率高,稳定性、重复性好,计数误差可控在 3% 以下,同时,仪器计数还避免了人工计数由于稀释、充池、计数等的人为误差,并大大提高了工作效率,尤其在标本量很大时,大大减少了工作量。手工法虽然能区分被台盼蓝染成蓝色的死细胞和不染色的活细胞,但死细胞比例不高,虽提高了充液量的精准和计数盘的精密度和准确度,但操作较复杂和费时,临床应用时,其变异系数常 15%~20%,所以最好是在自动血细胞分析仪计数不能读数 and 存在疑问时使用。PBMC 悬液脱离了血液的基质,但细胞培养液具有和体内细胞生活条件相接近的培养环境(如 pH 值、渗透压、黏度等),满足细胞生长需要,替代血清的保护作用,PBMC 仍保持细胞性状和活性。本实验结果与彭黎明等^[12]的一致,证明在 T-SPOT-TB 实验过程中的细胞悬液用 SYSMEX K-4500 血细胞分析仪检测和人工法符合性好,自动血细胞分析仪可替代人

• 质控与标规 •

工法来计数 PBMC。

参考文献

- [1] Soysal A, Bakir M. T-SPOT. TB assay usage in adults and children[J]. Expert Rev Mol Diagn, 2011, 11(6): 643-660.
- [2] 肖倩, 黄旭峰. T SPOT-TB 实验快速检测结核杆菌感染的临床应用研究[J]. 实验与检验医学, 2009, 27(3): 272-273.
- [3] Simsek H, Alpar S, Ucar N, et al. Comparison of tuberculin skin testing and T-SPOT. TB for diagnosis of latent and active tuberculosis[J]. Jpn J Infect Dis, 2010, 63(2): 99-102.
- [4] 隆维东, 彭田川, 江代红, 等. 全自动血细胞分析仪对胸水有核细胞计数的评价[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(15): 1744-1755.
- [5] 王鸿利, 洪秀华. 医学实验技术的理论与应用[M]. 上海: 上海科技教育出版社, 2004: 178-179.
- [6] 冯仁丰. 临床检验质量管理[M]. 上海: 上海科学技术文献出版社, 2007: 188-210.
- [7] Adams LV, Waddell RD, Von Reyn CF. T-SPOT. TB Test(R) results in adults with Mycobacterium avium complex pulmonary disease[J]. Scand J Infect Dis, 2008, 40(3): 196-203.
- [8] Higuchi K, Kawabe Y, Mitarai S, et al. Comparison of performance in two diagnostic methods for tuberculosis infection[J]. Med Microbiol Immunol, 2009, 198(1): 33-37.
- [9] Metcalfe JZ, Everett CK, Steingart KR, et al. Interferon- γ release assays for active pulmonary tuberculosis diagnosis in adults in low- and middle-income countries: systematic review and meta-analysis[J]. J Infect Dis, 2011, 204(Suppl 4): S1120-1129.
- [10] Sztajn bok FR, Boecha NL, Sztajn bok DC, et al. The challenge of pediatric tuberculosis in face of new diagnostic techniques[J]. J Pediatr (Rio J), 2009, 85(3): 183-193.
- [11] 李峤珂, 吴雪琼. T SPOT-TB 试剂盒在结核病临床诊断中的诊断价值[J]. 实用医学杂志, 2010, 17(26): 3117-3119.
- [12] 彭黎明, 李丽娟, 彭志勇, 等. 几种血细胞仪结果的比对和质控[J]. 中华检验医学杂志, 2000, 23(1): 94-97.

(收稿日期: 2011-12-12)

动脉血气分析的质量控制

王璇, 申丽红, 陈永德[△]

(中国中医科学院望京医院检验科 100102)

摘要:目的 临床动脉血气分析检测影响因素很多,为保障检验结果能真实反映患者身体的状况,特将分析前、分析中、分析后的质量控制加以总结,以确保检测结果的可靠性。**方法** 将动脉血气分析的影响因素细化,结合具体检测工作,总结出影响动脉血气分析检测的质量控制因素。**结果** 严格掌握动脉血气分析的的各项的质量控制因素,可以大大提高检测结果的可靠性。**结论** 注意影响血气分析的质量控制的各项因素,才能将实验数据更好地为临床所利用,同时减少医、患、技的冲突。

关键词: 动脉血气分析; 质量控制; 措施

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2012. 13. 045

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)13-1639-03

动脉血气分析是急症、重症患者病情监测的重要衡量依据之一。因此,结果是否真实反映患者的实际情况显得尤为重要,但由于诸多因素会影响检测结果的可靠性,这些因素可能并非全为医护人员甚至检验专业人员所了解。现作者将工作中出现的一些极易被忽视而又对检测结果稳定性产生重要影

响的因素总结如下,并对将采取的对措施进行探讨。旨在减少日常工作差错,减少医疗纠纷,为临床提供高质量的检测结果。动脉血气分析指的是包括对患者动脉血 PO_2 、 PCO_2 、pH、BE、 HCO_3^- 等指标的分析过程^[1],真实、可靠的实验结果对重症、急症患者的治疗和监护尤其重要^[2-3],但在整个动脉血气分

[△] 通讯作者, E-mail: wangjingykyd@sina. com。