

· 技术与方法 ·

红细胞叶酸检测仪性能评价*

杨桂花, 胡梅, 韩静, 张曼[△]

(首都医科大学附属北京世纪坛医院临床检验中心, 北京 100038)

摘要:目的 通过对国产红细胞叶酸检测仪进行性能分析,以验证其检测能力是否符合行业标准。方法 参考美国临床和实验室标准化协会 EP5-A2 文件,通过 20 d 测定 2 个水平质控物,获得精密度实验数据,计算批内、批间和实验室内变异系数(CV)并与生物学变异规定的要求相比较;按照 EP9-A2 文件,通过与 Beckman Coulter UniCel DxI800 全自动免疫分析仪测定结果比对验证仪器的正确度;参照 EP6-A 文件,用多项式回归法进行线性评价;通过测定 20 例能够合理代表健康总体的样本对仪器给定的参考范围进行验证。**结果** 批内 CV 小于 6.67%(1/4 生物学变异允许总误差),批间 CV 小于 8.90%(1/3 生物学变异允许总误差),实验室内 CV 小于 13.35%(1/2 生物学变异允许总误差);在医学决定水平处预期偏倚的可信区间小于允许的误差范围;二次和三次多项式系数与 0 比较差异均无统计学意义,检测系统呈线性;厂家给定的参考范围不适合本实验所在地人群。**结论** 国产红细胞叶酸检测仪精密度、正确度和线性符合要求;实验室应建立适合当地人群的参考范围。

关键词:红细胞叶酸;叶酸检测仪;性能评价

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.22.025

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)22-2635-03

Assessment of the performance of red blood cells folic acid analyzer*

Yang Guihua, Hu Mei, Han Jing, Zhang Man[△]

(Department of Clinical Laboratory, Beijing Shijitan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100038, China)

Abstract: Objective Through performance analysis of domestic red blood cells folic acid instrument to verify its testing ability. **Methods** According to national committee for clinical laboratory standards(NCCLS) EP5-A2, the precision was obtained through two level quality product detection within 20 days then the intra-assay variation coefficient(CV), inter-assay CV and CV in laboratory was calculated and compared with the precision requirement coming from the red blood cells folic acid biological variation. According to EP6-A, the linear evaluation was investigated with method of polynomial regression. By measuring the red blood cells folic acid from 20 persons who presented the total healthy people, the reference scope given by the manufacturer was verified. **Results** Within the group CV was less than 6.67%(1/4 of biological variation allow total error), between the group CV was less than 8.90%(1/3 of biological variation allow total error), the laboratory CV was less than 13.35%(1/2 of biological variation allow total error). At medical decision level, the calculated bias and the confidence limit were smaller than the allow range of error. Both factors of quadratic polynomial and cubic polynomial regression models were not statistically significant compared with zero, so detection system was linear. The reference scope given by manufacturer was not suitable for the local people. **Conclusion** The precision, accuracy and linearity of domestic red blood cells folic acid analyzer were accord with requirements. The laboratory should establish reference interval suitable for the local population.

Key words: blood cells folic acid; folic acid analyzer; performance assessment

血液中的叶酸缺乏与巨幼细胞贫血^[1]、高同型半胱氨酸血症^[2]、脑血管疾病^[3]以及胎儿神经管缺陷^[4]密切相关。了解体内叶酸水平对于合理补充叶酸、减少以上疾病发生至关重要,叶酸的检测对营养状态判断、疾病诊断和治疗监测非常重要。叶酸检测项目主要在大型医院开展,依靠国外大型仪器,成本昂贵,难以满足广大农村患者的需求。本文对国产的小型红细胞叶酸分析仪进行性能分析。通常一个检测系统应用到临床之前实验室必须对其进行性能验证^[5-7],最主要的性能指标包括精密度、正确度、检测线性范围以及参考范围是否符合当地人群^[8]。美国临床实验室标准化委员会(national committee for clinical laboratory, NCCLS)发布的 EP5 文件用于检验方法

的精密度评价^[9], EP9 文件用于检验方法的比较和偏差估计^[10], EP6 文件用于线性范围评估^[11]。本文按照以上文件设计实验,对仪器的精密度、正确度、线性范围和参考区间进行验证。

1 材料与方

1.1 材料 YS-YS-5300 型智能红细胞叶酸检测仪及配套的红细胞叶酸定量检测试剂(2 个批号分别为 20110512、20110820), BIO-RAD Immunoassay 质控品(美国伯乐公司免疫质控品, 中值批号: 40232, 高值批号: 40233), Beckman Coulter UniCel DxI800 全自动免疫分析仪及配套的叶酸检测试剂(批号: 117875), 配套校准品(批号: 110435), 样品为以 EDTA-

* 基金项目: 国家高技术研究发展计划(863 计划)基金资助项目(2011AA02A111); 首都卫生发展科研专项基金资助项目(2011-2008-02); 北京世纪坛医院科研项目(2011-C29)。 作者简介: 杨桂花(1977~), 博士, 检验医师, 主要从事医学检验质量控制研究。 [△] 通讯作者, Tel: (010)63926389; E-mail: mzhang99@yahoo.cn。

K_2 为抗凝剂的健康人抗凝血。严格按照试剂盒说明书及仪器实验参数设定操作程序进行操作。

1.2 方法

1.2.1 精密度性能评价 依据 NCCLS EP5-A2 文件规定,使用 2 个水平 BIO-RAD 叶酸质控品,每天分 2 批,每批实验同一浓度的质控物质做双份测定,2 批的间隔时间大于 2 h,连续检测 20 d。每个浓度获得 80 个可接受数据。计算批内不精密度($CV_{\text{批内}}$ 、 $S_{\text{批内}}$)、批间不精密度和实验室内总不精密度($S_{\text{总}}$ 、 $CV_{\text{总}}$);用 χ^2 检验判断获得的重复性和室内精密度数据与生物学变异允许误差比较。

1.2.2 正确度实验 依据 NCCLS 颁布的 EP9-A2 文件取新鲜患者标本 40 例,浓度从低于参考范围到远高于参考范围,尽可能在分析测量范围内均匀分布。使用 2 种方法每天测 8 个样本,每个样本重复检测 2 次,共测定 5 d。样本测定时指定第 1 次的顺序,按照相反方向测定第 2 次,排列顺序时浓度尽可能随机排列。然后进行数据收集、统计学分析、方法内和方法间离群值检验,以 2 种方法数据均值和差值作图,通过散点图观察 YS-YS-5300 型智能红细胞叶酸检测仪和 BeckmanDxI 800 测定结果是否呈直线关系,并进行比较方法结果(X)的合适范围检验,用相关系数 r 估计,如果 $r \geq 0.975$ 可以认为 X 取值范围合适,如果小于则需要更多的数据浓度分布范围,重新分析数据,如果无法扩大,则需采用分部残差法评价。计算给定的医学决定水平(X_c)处的预期偏倚(B_c)及 B_c 的 95% 可信区间。以允许总误差的 1/2 作为评价标准(红细胞叶酸的允许总误差为 26.7%),当预期偏倚小于可接受的偏倚则认为可以接受。

1.2.3 线性范围评价试验 依据 NCCLS EP 6-A 方案选择浓度覆盖分析测量范围上、下限的高值样本(H)和低值样本(L),分别为 1.65 ng/mL 和 26.3 ng/mL。将 H 和 L 样本按照 1.0L、0.8L+0.2H、0.6L+0.4H、0.4L+0.6H、0.2L+0.8H、1.0H 各自配制混合,形成 6 个系列评价样本。在保证仪器校准和质控状态良好情况下随机测量,每个样本重复测定 4 次。利用多项式回归分析方法判断非线性(二阶和三阶方程式)回归系数与 0 比较,比较差异是否有统计学意义。如果差异无统计学意义,则认为检测系统呈线性(一阶方程式)。

1.2.4 参考区间的验证 参照 NCCLS 颁布的 C28-A2 文件中提供的方法^[12],选择 20 例能够合理代表实验室所在区域健康总体的参考个体。检测以上个体红细胞叶酸水平,有不超过

10% 的观察值在原始报告的参考区间外则认为参考区间可以接受;如有 3 例以上超出界限,则重新选择 20 个参考个体,结果不超过 2 例(或 10%)的观察值在原始报告的参考区间外,则可以接受;再次有 3 例及以上超过给定的参考范围,需重新检查操作系统,如果操作没有问题,则认为该参考区间不适合于当地人群,需要重新建立参考区间。

2 结果

2.1 精密度评价结果 见表 1,批内变异系数(CV)小于基于生物学变异允许误差的 1/4,批间 CV 小于允许误差的 1/3,实验室变异小于允许误差的 1/2;本实验进行了重复性和室内精密度 χ^2 检验,计算的 χ^2 值分别为 21.64 和 27.42,小于 55.8 (自由度为 40 的 95% 上限临界值,通过查卡方界值表获得),结果也符合要求。

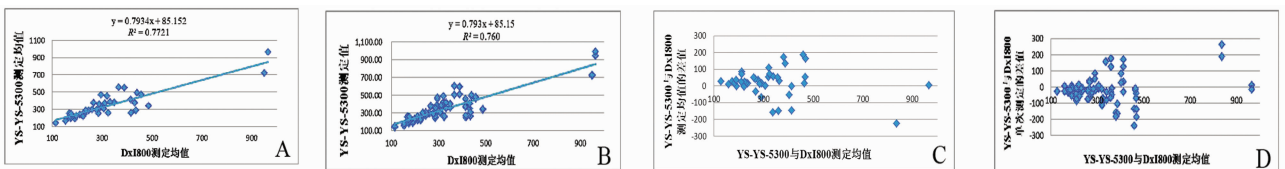
2.2 正确度评价结果

2.2.1 离群值检验 首先进行了 YS-YS-5300 和 DxI800 各自方法内离群值检验。计算每个方法重复测定平均差值绝对值,以该均值的 4 倍作为重复性测定的可接受限,结果方法内无离群值。计算 YS-YS-5300 和 DxI800 测定结果平均相对差值绝对值,以 4 倍平均绝对差值作为可接受限,2 种方法测定结果差值没有超过可接受限的,则认为方法间无离群值。

表 1 YS-YS-5300 型智能红细胞叶酸检测仪精密度结果(%)

评价的项目	中值质控 CV	高值质控 CV	允许误差	评价结果
批内不精密度	4.91	6.36	6.67	符合
批间不精密度	8.75	7.93	8.90	符合
室内不精密度	10.79	10.32	13.35	符合

2.2.2 数据作图 以 2 种方法检测的 80 对数据作图(图 1)。图 1 中 A 的横坐标是 DxI800 仪器 2 次测定结果的均值,纵坐标是 YS-YS-5300 测定 2 次结果的均值;B 的横坐标是 DxI800 仪器 2 次测定结果的均值,纵坐标是所有 YS-YS-5300 测定值(共 80 次);C 的横坐标是 DxI800 测定值和 YS-YS-5300 测定值的总均值,纵坐标是 DxI800 仪器 2 次测定结果的均值与 YS-YS-5300 测定 2 次结果的均值之间的差值;D 的横坐标是 DxI800 测定值和 YS-YS-5300 测定值的总均值,纵坐标是 DxI800 与 YS-YS-5300 单次测定结果之间的差值。



A:YS-YS-5300 测定均值对 DxI800 测定均值散点图;B:YS-YS-5300 单个测定值对 DxI800 测定均值散点图;C:YS-YS-5300 与 DxI800 测定差值与 2 种方法均值的偏倚图;D:YS-YS-5300 与 DxI800 单次测定差值与 2 种方法均值的偏倚图。

图 1 YS-YS-5300 与 DxI800 结果比对分析图

2.2.3 X 值合适范围检验结果 通过对 2 种方法测定的 80 对数据进行相关分析,计算相关系数 r 为 0.8718,小于 0.975,故不能用线性回归法计算预期偏倚,采用分步残差法分析。将数据按照 X 值(DxI800 测定结果)递增的顺序分为 3 组,第 1

组和第 2 组均为 26 个数据,第 3 组为 27 个数据,用分步残差法计算每组数据的预期偏倚。

2.2.4 预期偏倚及可信区间计算 判断新生儿神经管畸形红细胞叶酸的医学决定水平是 400 ng/mL^[6],生物学变异规定的

允许误差是 26.7%，以 1/2 允许总误差作为的偏倚的可接受水平，则在 400 ng/mL 时允许的测定范围是 346.6~453.4 ng/mL。用分步残差法计算医学决定水平处 Bc 的估计值为 402.37 ng/mL，Bc 的 95% 可信区间为 355.58~449.15 ng/mL，小于生物学变异允许的范围，所以认为 YS-YS-5300 与 DxI800 测定结果相当。

2.3 线性范围评价结果 对 6 个系列评价样本分别检测 4 次后进行多项式回归分析，结果拟合的二次多项式系数 b2 和三次多项式模型系数 b2 和 b3 与 0 比较差异均无统计学意义，故判断检测系统呈线性（一阶方程式），见表 2 和图 2。

表 2 拟合系数及拟合系数 P 值

系数	一次拟合	二次拟合	三次拟合	一次系数 P 值	二次系数 P 值	三次系数 P 值
b0	—	-3.841	-7.931	0.130	0.135	0.137
b1	4.496	5.911	11.057	0.000	0.017	0.098
b2	—	-0.202	-1.906	—	0.256	0.252
b3	—	—	0.162	—	—	0.166

—：此项无数据。

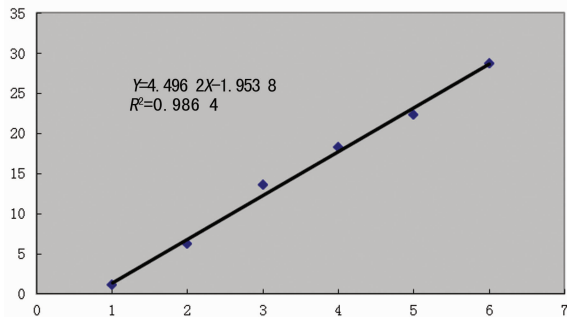


图 2 线性拟合线

2.4 参考区间验证结果 通过测量 20 例实验室选择的健康参考个体，其中有 7 例超过了仪器给定的参考区间（参考范围 280~791 ng/mL），重新选择 20 例能够代表健康整体的个体检测，仍然有 9 例超过参考区间，所以认为使用 280~791 ng/mL 作为实验室参考范围是不合理的。

3 讨论

检验医学是疾病诊断和病情评估的一个基础组成部分。随着医疗水平的不断提高，检验结果越来越多地被用于疾病的筛查、诊断、治疗监测及预后的判断，故检验结果的准确性直接影响到对疾病的判断。体内叶酸水平直接影响 DNA 合成，叶酸缺乏可导致巨幼细胞贫血、高同型半胱氨酸血症以及胎儿神经管畸形^[13]，故越来越多的检验科开展叶酸检测。红细胞叶酸不受短时间叶酸摄入情况的影响，故更能准确地反映体内叶酸的实际情况。

目前，国内外对于医学实验室质量管理要求主要是以美国临床实验室改进法案修正案（CLIA'88）、美国病理学家协会（CAP）的实验室认可计划以及国际标准化组织制定的标准 ISO15189 医学实验室认可为主。检测系统性能参数进行验证主要依照美国 NCCLS 颁布的 EP 文件。本研究参照 NCCLS EP5-A2 文件的精密性评价方案、EP9-A2 文件的正确度验证方案和 EP6-A 文件的线性评价方案对国产的小型红细胞叶酸检测仪评价。精密性性能验证结果显示，测定中值、高值质控

物批内 CV 均小于 1/4 生物学变异允许总误差（26.7%），批间 CV 小于 1/3 生物学变异允许总误差，实验室内 CV 小于 1/2 生物学变异允许总误差。说明该仪器精密性能够满足要求。

在正确度性能验证分析中，X 合适范围检验结果 r 小于 0.975，故未通过数据合适范围和均匀离散度检验，可能与本次实验选择高值样本较少有关。根据 EP9-A2 文件将数据分为 3 个部分，用分步残差法计算预期偏倚，结果在医学决定水平处预期偏倚的可信区间小于生物学变异允许的误差范围。故认为该仪器检测结果与 Beckman DxI800 封闭系统可比，正确度性能符合要求。利用 EP6-A 进行线性验证是利用多项式回归评价方法，首先假设数据点是非线性的，通过非线性多项式拟合数据，如果数据的最适合模型符合一次、二次和三次多项式，可得到回归方程，对非线性系数进行统计学分析。如果有统计学意义的非线性系数，则该组数据呈非线性，否则为线性。通过实验得出拟合的二次多项式系数 b2 和三次多项式模型系数 b2 和 b3 与 0 比较差异均无统计学意义，故判断该检测系统呈线性。

参考范围对于判断检测结果、生理状态、疾病预后等具有至关重要的作用，但往往受到多种因素的影响。本实验先后 2 次分别选用 20 例能够合理代表健康总体的参考个体对仪器给定的参考范围进行验证，结果 2 次均有大于 3 例的结果超出给定参考范围，故认为该范围不适合实验室当地的人群，需要重新建立参考范围。国内学者对婚检妇女营养的调查发现叶酸水平存在地区差异、城乡差异和季节差异^[14]。美国在第 3 次全国健康与营养调查研究时，进行了叶酸水平与种族、文化程度等相关性的研究，结果发现叶酸水平存在明显的种族差异，膳食叶酸摄入量、生活习惯等可以影响体内叶酸水平^[15]。可见叶酸水平受不同人群、饮食、生活习惯、地理位置和不同的实验方法等许多因素的影响；目前，中国大多数实验室叶酸参考范围均来源于国外试剂厂家说明书，其研究对象来源于外国人群，遗传背景、饮食及生活习惯明显不同于中国人群，用此参考范围往往难以做出正确的判断。所以，各地实验室应建立本地地区的叶酸正常参考值范围。

参考文献：

- [1] 陈志云,马绍钧. 巨幼细胞贫血病:中文医学期刊临床报告资料综述及提示[J]. 临床血液学杂志, 2012, 25(7): 421-424.
- [2] 李海华,张丽伟,李小凤. 高同型半胱氨酸血症与缺血性脑卒中相关性的研究进展[J]. 重庆医学, 2012, 41(5): 500-502.
- [3] 胡晓芳,安殿梅,袁笑,等. 脑血管病患者高 Hcy 血症与叶酸和维生素 B₁₂ 的相关性研究[J]. 中国实验诊断学, 2012, 16(5): 807-809.
- [4] 高宝英,吴丽华,刘清. 孕妇血清叶酸、同型半胱氨酸水平与胎儿神经管畸形危险性研究[J]. 中国生育健康杂志, 2009, 20(4): 200-203.
- [5] 冯仁丰. 临床检验质量控制技术基础[M]. 上海:上海科学技术文献出版社, 2007:129-130.
- [6] 丛玉隆. 临床实验室管理[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2004:48-50.
- [7] 魏昊,丛玉隆. 医学实验室质量管理与(下转第 2640 页)

成纤维细胞在数量上不及心肌细胞,但成纤维细胞具有增殖分化能力,生长迅速,且贴壁较心肌细胞早,若不加以控制,则会生长成为优势细胞,严重影响心肌细胞的纯度和生长状态。在此,可以利用成纤维细胞较心肌细胞贴壁早的特点,在培养 60~90 min 时,大部分成纤维细胞已贴壁而心肌细胞尚未贴壁。采用差速贴壁的方法可除去大部分成纤维细胞。差速贴壁剩下的少量成纤维细胞可通过在培养基中加入溴脱氧尿苷(BrdU)以抑制成纤维细胞的 DNA 和蛋白质合成^[7]加以控制。本实验室经过差速贴壁和 BrdU 处理后,心肌细胞的纯度一般可达 95% 以上,完全可用于后续试验。另外,小鼠心肌细胞比较脆弱,在各操作步骤中若时间与力度控制不是很准确时,则会遇到心肌细胞贴壁不好的情况。根据作者的经验,此时可用 1% 明胶包被培养皿则可良好贴壁。

3.5 接种密度 心肌细胞接种密度不仅可影响细胞间的相互接触,并且会影响细胞长期培养的成活率^[8]。接种细胞的密度应根据实验观测目的而定。一般而言,若需单个心肌细胞贴壁生长,如作形态学观测,6 孔板中每孔的接种细胞数量应控制在 $(1\sim 2)\times 10^5$ 个;若需心肌细胞形成单层细胞或多层细胞,或形成细胞簇,如收获心肌细胞作 mRNA 或蛋白表达水平的观测时,则每孔的接种密度可增加至 $(5\sim 6)\times 10^5$ 个。

3.6 其他 其他影响因素包括培养液的 pH 值,pH 值为 7.0~7.2 时更利于细胞的生长^[9],且培养液随着放置时间的延长 pH 值逐渐升高,因此,最好现配现用。若操作技术娴熟,培养液里可不加抗菌药物。本实验发现培养液里不加抗菌药物时,心肌细胞生长状态更为良好;换液时间太短或太长均不利于心肌细胞生长,以肉眼可见培养液颜色改变即 pH 值改变时换液即可。

4 结 语

小鼠心肌细胞在培养技术上还存在着一定的难度,如何简化分离、纯化步骤、提高心肌细胞存活率和纯度仍是小鼠心肌细胞培养技术的关键。随着各种基因敲除和转基因小鼠在心血管疾病机制研究中的广泛应用,相信与之相对应的小鼠心肌细胞体外模型会将心血管疾病的机制研究在细胞和分子水平上推向一个新的高度。

参考文献:

- [1] Brand NJ, Lara-Pezzi E, Rosenthal N, et al. Analysis of cardiac myocyte biology in transgenic mice; a protocol for preparation of neonatal mouse cardiac myocyte cultures [J]. *Methods Mol Biol*, 2010, 633: 113-124.
 - [2] Jones BW, Brunet S, Gilbert ML, et al. Cardiomyocytes from AKAP7 knockout mice respond normally to adrenergic stimulation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109 (42): 17099.
 - [3] Sreejita P, Kumara S, Vermaa RS, et al. An improved protocol for primary culture of cardiomyocyte from neonatal mice [J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Animal*, 2008, 44(3&4): 45.
 - [4] Liao R, Jain M. Isolation, culture, and functional analysis of adult mouse cardiomyocytes [J]. *Methods Mol Med*, 2007, 139: 251-262.
 - [5] Wyatt KE, Bourne JW, Torzilli PA. Deformation-dependent enzyme mechanokinetic cleavage of type I collagen [J]. *J Biomech Eng*, 2009, 131(5): 051004.
 - [6] 阳海鹰, 丁巍, 丁爱石, 等. 新生小鼠心肌细胞培养模型的建立及其在毒性评价研究中的应用 [J]. *军事医学科学院院刊*, 2010, 34(1): 30-33.
 - [7] 李琳, 龙超良, 汪海. 埃他卡林对心肌细胞损伤保护作用的药理学特征 [J]. *中国药理学通报*, 2011, 27(4): 497-500.
 - [8] Gissel C, Doss MX, Altenburg RH, et al. Generation and characterization of cardiomyocytes under serum-free conditions [J]. *Methods Mol Biol*, 2006, 330: 191-219.
 - [9] Bers DM, Barry WH, Despa S. Intracellular Na^+ regulation in cardiac myocytes [J]. *Cardiovasc Res*, 2003, 57(4): 897-912.
- (收稿日期: 2013-01-23 修回日期: 2013-04-22)
-
- (上接第 2637 页)
- 认可指南[M]. 北京: 中国计量出版社, 2004: 72-75.
- [8] 毕波, 吕元. 定量检测方法学性能验证的系统设计 [J]. *中华检验医学杂志*, 2007, 30(2): 143-145.
 - [9] NCCLS. EP5-A2; Evaluation of precision performance of quantitative measurement methods; approved guideline-second edition [S]. Wayne, PA, NCCLS; 2004.
 - [10] NCCLS. EP9-A2; Method comparison and bias estimation using patient samples; approved guideline-second edition [S]. Wayne, PA, NCCLS; 2002.
 - [11] NCCLS. EP6-A2; Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures; a statistical approach; approved guideline [S]. Wayne, PA, NCCLS; 2003.
 - [12] NCCLS. C28-A2; LHow to define and determine reference intervals in the clinical laboratory; approved guideline-second edition [S]. Wayne, PA, NCCLS; 2000.
 - [13] Bailey LB. Folate in health and disease [M]. 2Ed. Boca Raton, FL; CRC Press, 2010, 6: 90-94.
 - [14] 王华, 李敏, 吕莉, 等. 天津市新婚人群血清叶酸水平现况调查及正常参考值 [J]. *中国妇幼保健*, 2011, 26(30): 4698-4702.
 - [15] Ford ES, Bowman BA. Serum and red blood cell folate concentrations, race, and education; findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey [J]. *Am J Clin Nutr*, 1999, 69(3): 476-482.
- (收稿日期: 2013-02-16 修回日期: 2013-05-24)