

游离血红蛋白室内质控物的制备及应用^{*}

马静瑶,郭 滔 (淮北市中心血站,安徽淮北 235000)

摘 要:目的 制备游离血红蛋白(FHb)室内质控物,并对其性能进行评价。方法 ①选取5份已知血红蛋白(Hb)浓度的正常人类全血,用蒸馏水分别以1:500,1:1 000,1:2 000,1:4 000的比例进行稀释,充分混匀后配制成20份FHb溶液,检测其FHb浓度,并与其理论浓度进行比较。②选择高值、低值溶液各1份,作为日常室内质控物,混匀分装-20℃保存,常规条件下连续检测20天,计算两组的 \bar{x} , s 和CV值,绘制Levey-Jennings质控图;之后每周测定一次,将数据依次标记在质控图上,直至更换试剂批号;计算高值、低值两种质控物整个检测周期内的总体 \bar{x} , s 和CV值。结果 ①该20份标本的FHb浓度理论值和实测值($\bar{x}\pm s$)分别为 125.44 ± 93.04 mg/L和 125.22 ± 93.08 mg/L,差异无统计学意义($t=0.706, P>0.05$)。②高值、低值质控物连续20天检测结果($\bar{x}\pm s$)分别为 303.55 ± 3.70 mg/L和 69.29 ± 1.88 mg/L, CV值分别为1.22%和2.68%;高值、低值质控物整个检测周期内结果均未失控,总体($\bar{x}\pm s$)分别为 302.56 ± 3.99 mg/L和 69.04 ± 1.88 mg/L, CV值分别为1.32%和2.71%。结论 FHb室内质控物制备过程简单,质量可靠,稳定性好,适合在血站和临床实验室中应用和推广。

^{*} 作者简介:马静瑶(1980—),女,硕士,主管检验师,主要从事血液学检验及质量控制工作, Tel:18956187629, E-mail:clear224@163.com。

关键词:游离血红蛋白;质控物;评价

中图分类号:R446 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2015)04-117-03

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2015.04.034

Preparation and Application of Internal Quality Control Substance of Free Hemoglobin

MA Jing-yao, GUO Tao (Huaibei Central Blood Station, Anhui Huaibei 235000, China)

Abstract: Objective To prepare an internal quality control substance of free hemoglobin (Fhb), and evaluate its performance. **Methods** ① 5 normal whole human blood samples with known hemoglobin (Hb) concentration was selected and diluted with distilled water in the ratio of 1:500, 1:1 000, 1:2 000, 1:4 000 respectively. After 20 Fhb solutions was fully mixed, the concentration of Fhb solutions was tested and compared with its theoretical data. ② One of the highest value and the lowest value solutions were chosen as quality control substance, packed and stored in -20°C fridge. Each group was analyzed 20 days continuously in the routine conditions, where average (\bar{x}) of the groups, standards deviation (s) and coefficients of variation (CV) were calculated and Levey-Jennings control chart was conducted. Then, the test was repeated every week, and the data on the chart was updated accordingly until (CV) of the reagents were changed. The average (\bar{x}) of the groups, standards deviation (s) and coefficients of variation quality control material was calculated during the whole test period. **Results** ① The theoretical value ($\bar{x} \pm s$) of the concentration of free hemoglobin was 125.44 ± 93.04 mg/L, and the actual value was 125.22 ± 93.08 mg/L, there was no statistic significance (t value was 0.706, $P > 0.05$). ② During 20 continuously daystest, the detected values ($\bar{x} \pm s$) of the highest quality control material was 303.55 ± 3.70 mg/L; the values of the lowest quality control material was 69.29 ± 1.88 mg/L. The coefficients were 1.22% and 2.68% respectively. Both the highest and the lowest quality control material were under control during the whole detecting period. The ($\bar{x} \pm s$) values of the highest was 302.56 ± 3.99 mg/L, the CV value of it was 1.32%; The ($\bar{x} \pm s$) values of the lowest was 69.04 ± 1.88 mg/L, the CV value of it was 2.71%. **Conclusion** The preparation method of internal quality control substance of free hemoglobin is convenient and stable, and was applicable in blood station's and clinical laboratory.

Keywords: free hemoglobin; quality control substance; evaluation

血浆或上清液游离血红蛋白(Fhb)浓度是反映全血及红细胞类血液成分溶血情况的重要指标,同时也是临床上诊断溶血性输血反应和溶血性疾病的主要指标,因而Fhb浓度检测成为我国血站质量控制实验室和临床血液病实验室经常需要开展的项目,但目前市面上没有商品化的Fhb室内质控物出售,为确保Fhb浓度检测试验的有效性,笔者试着自制Fhb室内质控物,并对其浓度进行标定,对其稳定性进行评价,结果满意,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 样本来源 健康无偿献血者全血样本5份。

1.2 试剂 微量游离血红蛋白测定试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号:20130711)。

1.3 仪器 全自动血液分析仪(KX-21N,日本Sysmex公司);紫外-可见分光光度计(UV1700-1800,上海凤凰光学科仪有限公司)。

1.4 方法

1.4.1 制备方法:挑选5份健康无偿献血者的全血样本,在全自动血液分析仪上测定各自的Hb含量。每份全血样本各取一定的量,分别用蒸馏水进行1:500, 1:1 000, 1:2 000, 1:4 000比例的稀释,充分混匀,配制成Fhb溶液(共计20份)。

1.4.2 质控物定值:由于5份全血的Hb含量是已知的,根据稀释倍数可以分别计算得到该20份溶液的Fhb浓度的理论值。再将这20份Fhb溶液作为待测标本,按照微量游离血红蛋白(Fhb)测定试剂盒说明书的要求,检测每份标本中Fhb的实际浓度(每份标本均重复测定两次,取

平均值)。将该20份溶液Fhb浓度的理论值与实测值结果进行差异性比较,对每份Fhb溶液浓度进行标定。

1.4.3 稳定性评价

1.4.3.1 质控物的分装、保存及复融:从该20份标本中选取高值(300 mg/L左右)、低值(70 mg/L左右)两种浓度的溶液,作为日常室内质控物,对每种溶液分别充分混匀,分装至高压灭菌离心管(规格0.5 ml)中,每管装样400 μl ,盖盖后离心数秒,封口膜封口、标记后直立放入 -20°C 冰箱冷冻保存。每次实验前各取出1支质控物,室温自然融化后,充分震荡混匀,离心数秒后使用^[1]。

1.4.3.2 检测方法:每天测定高值、低值两种质控物的Fhb浓度,连续检测20天,之后每周测定一次,直至更换试剂批号。

1.5 统计学分析

1.5.1 质控物定值:采用SPSS16.0软件进行数据分析,计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,结果采用 t 检验分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

1.5.2 稳定性评价:计算高值、低值质控物连续20天检测的 \bar{x} , s 和CV值,在Excel软件上分别绘制Levey-Jennings质控图,之后每周测定的数据依次标记在质控图上,并计算两种质控物整个检测周期内的总体 \bar{x} , s 和CV值。

2 结果

2.1 配制的Fhb浓度理论值与实测值的比较 20份待测标本Fhb浓度的理论值(125.44 ± 93.04 mg/L)与实测值(125.22 ± 93.08 mg/L)比较差异无统计学意义($t = 0.706$, $P > 0.05$)。

2.2 稳定性评价

2.2.1 连续20天(2013年7月20日~8月8日)检测结果:高值质控物($\bar{x} \pm s$)和CV值为:303.55 \pm 3.70 mg/L和1.22%;低值质控物($\bar{x} \pm s$)和CV值为:69.29 \pm 1.88 mg/L和2.68%。

2.2.2 整个周期(2013年7月20日~10月8日)检测结果:高值质控物($\bar{x} \pm s$)和CV值为:302.56 \pm 3.99 mg/L和1.32%;低值质控物($\bar{x} \pm s$)和CV值为:69.04 \pm 1.88 mg/L和2.71%。

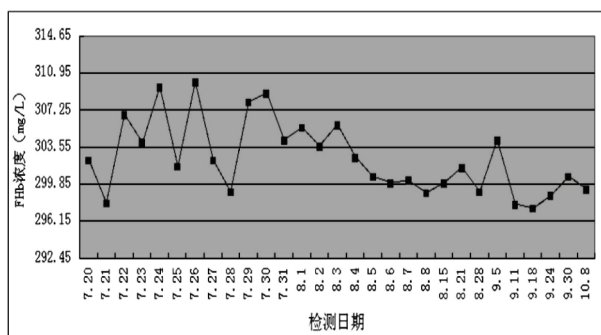


图1 自制Fhb高值室内质控物的质控结果

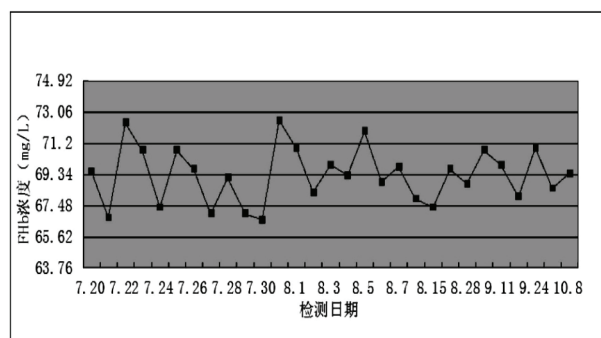


图2 自制Fhb低值室内质控物的质控结果

由图1,图2可见,在整个检测周期内(2013年7月20日~10月8日)两种质控物均未出现失控情况。

3 讨论 全血及红细胞类血液成分在保存过程中,红细胞会造成不同程度的破坏,原因是红细胞膜上的脂蛋白和脂质成分会随着保存期的延长而逐渐减少,细胞内 K^+ 降低, Na^+ 和 Ca^{2+} 升高,红细胞变形力下降,渗透脆性增加,一旦受到外界因素影响,会造成Hb从细胞中逸出,形成Fhb^[2]。除此之外,悬浮红细胞由于去除了大部分血浆营养成分,以及在离心、分浆过程中对红细胞造成的挤压等多种因素,都会导致Fhb的生成。

临床上测定Fhb含量用于反映溶血性贫血病人血中红细胞的破坏情况。血浆Fhb增加是血管内溶血的重要指征,当血管内溶血释放的Hb超过珠蛋白的结合能力时,血浆中Fhb升高,常见于阵发性睡眠性血红蛋白尿(PNH)、溶血性输血反应、自身免疫性溶血性贫血等^[3]。

综上所述,Fhb含量测定成为临床和血站实验室经常需要开展的检测项目。《全国临床检验操作规程(第3版)》中的血浆Fhb测定采用邻-甲联苯胺法^[3],该方法操作繁琐,试剂配制过程复杂,不利于推广。本着既保证实验的准确性,又能够减轻实验操作人员负担的原则,我站质量控制

实验室经过反复研究比较,决定使用南京建成生物工程研究所生产的《微量游离血红蛋白试剂盒》,该试剂盒是一套成熟的商品化试剂盒,具有操作方便、省时省力等优点,使用后大大降低了实验人员的工作量。

室内质控的主要目的是检测实验的精密度,控制其准确度,并提高检测结果的一致性。使用室内质控品是开展室内质控最简便有效的手段,但是由于该试剂盒没有配备质控物质,市面上也无法购买Fhb质控物,笔者经过反复实验,决定采用人类全血,经过蒸馏水的高倍稀释,利用渗透压原理,导致红细胞膜破裂,血红蛋白完全释放,来配制Fhb质控物的方法。

由于全血中Hb浓度是可测的,经过高倍稀释并混匀后,红细胞中的Hb完全释放至溶液中,成为Fhb溶液。原血中的Hb浓度乘以稀释倍数,即可计算得出配置的Fhb质控物的浓度。对于这个理论设想,笔者通过上述1.4.2步骤进行了验证,从结果中可以看出配置的Fhb溶液其浓度的理论值和实测值,采用 t 检验分析,差异无统计学意义($P < 0.05$),说明此种方法能够使红细胞中的Hb完全释放至溶液中,成为Fhb,因而用此种方法配制Fhb质控物这个理论设想是可行的,同时通过此为配制的Fhb溶液进行定值。

作为室内质控物,还需具备以下特性:一是在适当的存放条件下,有良好的稳定性;二是质控物浓度与临床应用相适应^[3]。根据日常检测的全血及红细胞类血液成分上清液的Fhb浓度范围,分别挑选了高值(300 mg/L左右)、低值(70 mg/L左右)两份Fhb溶液作为室内质控物,严格分装、保存。为检测自制质控物的稳定性,按照常规生化类室内质控物的使用方法进行检测。收集质控物在试剂盒有效期(3个月)内的质控数据,绘制Levey-Jennings质控图。由质控图(图1,图2)可见该自制Fhb室内质控物具有良好的稳定性,在后期高值、低值Fhb室内质控物的检测结果均比它们前期连续20次的检测结果略微偏低。至于此自制质控物的有效期,还有待于通过进一步的实验研究来确定。

总之,此种配制Fhb室内质控物的方法操作简单,结果可靠,稳定性好,适合在血站和临床实验室中推广应用。

参考文献:

- [1] 邓演超,李全双,沈红艳,等. 自制HBV-DNA质控物的稳定性评价[J]. 现代检验医学杂志, 2012, 27(5): 158-160.
Deng YC, Li QS, Shen HY, et al. Evaluation of the stability of self-made quality control substance of HBV-DNA[J]. J Mod Lab Med, 2012, 27(5): 158-160.
- [2] Zhang F, Li H, Pendleton AR, et al. Thymidine kinase 1 immunoassay: a potential marker for breast cancer[J]. Cancer Detect Prev, 2001, 25(1): 8-15.
- [3] 叶应妩,王毓三,申子瑜. 全国临床检验操作规程[S]. 3版. 南京:东南大学出版社, 2006: 164-165.
Ye YW, Wang YS, Shen ZY. National Clinical Laboratory Procedures[S]. 3th Ed. Nanjing: Southeast University Press, 2006: 164-165.

收稿日期:2015-01-04

修回日期:2015-06-16