

2 结 果

149 例标本中, 抗-HCV 阳性率为 70.47% (105/149), HCV RNA 阳性率为 59.73% (89/149), 两者差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 1。

表 1 149 例抗-HCV 和 HCV 核酸检测结果比较

类别	HCV 核酸扩增检测		
	>1 000 copy	<1 000 copy	合计
抗-HCV 阳性	85	20	105
抗-HCV 阴性	4	40	44
合计	89	60	149

$\chi^2 = 66.58, P < 0.005$ 。

3 讨 论

在 105 例抗-HCV 阳性中有 20 例 HCV RNA 阴性, 部分原因可能为抗-HCV 呈假阳性, 也可能与 HCV 病毒血症消退或病毒基因变异等因素有关^[5-7]。或者因为标本保存或处理不当, 在核酸提取时, 核酸量太少而提取失败; 也可能与试剂的灵敏度或存在某些抑制扩增的因素存在, 这些都有可能影响到核酸的检出^[8]。有报道称仅有 55% 的抗-HCV 阳性患者检出 HCV RNA, 病毒可能自发性消失^[9-10]。本组 4 例患者 HCV RNA 阳性但抗-HCV 阴性, 可能与下列因素有关: (1) HCV 变异株的感染, 检测试剂盒内不存在相应抗原, 检测不出抗-HCV。(2) 机体的免疫功能低下, 不能产生相应的免疫应答。(3) 标本处于 ELISA 检测的“灰区”, 及 S/CO 在 1.0 左右。(4) 患者处于抗-HCV 的“窗口期”, 机体未产生相应的抗体。

长期以来, 临床上习惯依赖于检测抗-HCV 作为诊断丙型肝炎患者的根据。实际上血清学方法检测的是 HCV 的表达产物, 反映机体对 HCV 的免疫反应状态, 是免疫学指标, 并不能全面反映丙型肝炎患者体内 HCV 的感染情况。而 HCV RNA 的检测, 直接反映了 HCV 本身状况, 包括感染和恢复等

情况, 为丙型肝炎病情的诊断和后期抗病毒治疗的疗效观察提供了最直接的依据。

参考文献

- [1] Hagiwara H, Hayashi N, Mita E, et al. Quantitation of HCV RNA in serum of asymptomatic blood donors and patients with types C chronic liver disease[J]. *Hepatology*, 1993, 17(9): 545-550.
- [2] Kagawa T, Saito H, Tada S. Is hepatitis C virus cytopathic[J]. *Lancet*, 1993, 341(4): 316-317.
- [3] Zhang SL, Liang XS, Lin SM, et al. Relation between viremia level and liver disease in patients with chronic HCV infection[J]. *China Natl J New Gastroenterol*, 1996, 2(41): 115-117.
- [4] Lau JYN, Davis GL, Kinffien J. Significance of serum HCV RNA levels in CHC[J]. *Lancet*, 1993, 341(8): 1501-1504.
- [5] Gretch D, Corey L, Wilson J. Assessment of HCV RNA levels by QC-PCR: high titer viremia correlates with advanced stage of disease[J]. *J Infect Dis*, 1994, 169(17): 1219-1225.
- [6] Kumar U, Thomas HC, Monjardino J. Serum HCV RNA levels in chronic HCV hepatitis measured by quantitative PCR assay: correlation with serum AST[J]. *J Virol Methods*, 1994, 47(4): 95-102.
- [7] 季阳, 庄文, 杨翠, 等. 丙型肝炎病毒感染的献血者 10 年追踪观察[J]. *中国输血杂志*, 2004, 17(6): 399-403.
- [8] 徐明忠, 王赤林. 抗-HCV 阳性反应血清的 HCV 核酸检测分析[J]. *中国输血杂志*, 2006, 19(5): 393-394.
- [9] 王丽红, 译. 丙型肝炎自然史的确认为何如此困难[J]. *国外医学: 输血及血液学分册*, 2002, 25(3): 278-279.
- [10] 蔡红军, 袁克宇, 丁玉美, 等. 荧光定量 PCR 检测 HCV-RNA 和 ELISA 检测抗-HCV 的比较[J]. *临床输血与检验*, 2008, 1(6): 54-55.

(收稿日期: 2010-08-22)

• 经验交流 •

血清磷测定结果假性升高原因分析及解决办法

高应东, 张瑞生, 夏永祥[△]

(南京医科大学附属南京第一医院医学检验科 210006)

摘要:目的 探讨引起血清磷测定升高的原因并研究解决办法。方法 利用混合血清, 通过不同项目之间的测试顺序重复测定血清磷浓度并计算出携带污染率, 采用浸泡搅拌棒等方法处理携带污染。结果 α -羟丁酸脱氢酶(α -HBDH)、尿酸(UA)试剂对磷(P)的携带污染率分别为 4.4%~56.3%、0.0%~15.7%, 其他测试项目对血清磷无携带污染。结论 α -HBDH 及 UA 对磷测定有显著污染, 可通过浸泡搅拌棒, 分单元测定或分内外圈测定的方法加以解决。

关键词:血清; 磷测定; 自动生化分析; 携带污染

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.07.039

文献标识码: B

文章编号: 1673-4130(2011)07-0800-03

在日常工作中发现血清磷测定结果经常超过正常参考范围的上限, 每隔一定数量的样本出现一些高值, 重复测定, 结果又都在正常范围之内, 似乎无一定规律性。通过反应曲线(re-actition monitor)发现, 在测试反应测试时间点(POINT)的第 10~12 之间, 吸光度(OD)值有一个显著上升, 根据 Olympus 仪器测定的工作原理及血清磷测定的原理(单试剂), 此吸光度的上升应可能为 R2 搅拌棒携带污染所致。处理 R2 搅拌棒后, 反应曲线正常。现探讨如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 随机选取 10 例健康体检者新鲜血清混匀而成。

1.2 仪器与试剂 日本 Olympus AU5421 自动生化分析仪(2009 年 3 月购买)。无机磷试剂(直接紫外法)为上海复兴长征医学科技有限公司产品; α -羟丁酸脱氢酶(α -HBDH)、肌酸激酶(CK)、肌酸激酶同工酶(CKMB)、乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒均为四川迈克科技股份有限公司产品; 低密度脂蛋白胆固醇

[△] 通讯作者, E-mail: xyx518@21cn.com。

(LDL-C)试剂盒为日本第一化学公司产品;尿酸(UA)试剂盒为南京威特曼公司产品; β_2 -微球蛋白(β_2 -MG)试剂盒为上海执诚公司产品。

1.3 方法

1.3.1 搅拌棒携带污染的检测^[3] 将混合血清分装成 7 份(每一测试项目 1 份),每份加入 5 个样品杯中。测定顺序如下: α -HBDH、P、P、P、P; α -HBDH、P、P、P、P;CK、P、P、P、P;CKMB、P、P、P、P……其中第 1 个样品杯是怀疑可能带来污染的项目,第 2~5 个样品杯重复测定被污染项目 P,记录 4 次测定磷的浓度值(P1、P2、P3、P4),每一组重复测定 1 次。接着再测下一个怀疑可能带来污染的项目。根据 Olympus 仪器的工作原理,其中 P3 反映搅拌棒携带污染,P4 作为对照,按以下公式计算携带污染率。搅拌棒携带污染率=(P3-P4)/100%,为磷测定的均值(除外携带污染值)。

1.3.2 磷测定的方法 采用磷钼酸盐复合物直接紫外分析法,反应生成的未还原磷钼酸盐复合物与样本中磷的浓度成正比。通过 340 nm 处测定吸光度的变化值,即可测得样本中无机磷的浓度(mmol/L)。其他测试项目按试剂盒说明书进行。

2 结 果

2.1 各测试项目对血清磷携带污染检测结果 见表 1。

表 1 各测试项目对血清磷测定携带污染检测的结果

可能带来污染的项目	P1	P2	P3	P4	携带污染率(%)
α -HBDH	1.14	1.13	1.18	1.13	4.4
α -HBDH	1.14	1.14	1.77	1.13	56.3
CK	1.14	1.14	1.11	1.14	-2.6
CK	1.14	1.14	1.11	1.13	-1.8
CKMB	1.12	1.10	1.13	1.14	-0.9
CKMB	1.15	1.12	1.13	1.14	-0.9
LDH	1.10	1.12	1.11	1.13	-1.8
LDH	1.10	1.13	1.11	1.13	-1.8
LDL-C	1.12	1.11	1.11	1.13	-1.8
LDL-C	1.13	1.13	1.12	1.13	-0.9
UA	1.14	1.13	1.12	1.12	0.0
UA	1.16	1.15	1.32	1.14	15.7
β_2 -MG	1.12	1.11	1.11	1.13	-1.8
β_2 -MG	1.13	1.16	1.11	1.14	-2.6

2.2 R2 搅拌棒经处理后血清磷的测试结果 见表 2。

表 2 搅拌棒处理后各测试项目对血清磷测定影响的结果

可能带来污染的项目	P1	P2	P3	P4	携带污染率(%)
α -HBDH	1.14	1.15	1.16	1.15	0.9
α -HBDH	1.15	1.16	1.18	1.16	1.7
CK	1.14	1.15	1.14	1.14	0.0
CK	1.14	1.16	1.14	1.14	0.0
CKMB	1.14	1.14	1.13	1.14	-0.9
CKMB	1.13	1.14	1.12	1.15	-2.6
LDH	1.16	1.13	1.15	1.13	1.7
LDH	1.16	1.15	1.13	1.15	-1.7

续表 2 搅拌棒处理后各测试项目对血清磷测定影响的结果

可能带来污染的项目	P1	P2	P3	P4	携带污染率(%)
LDL-C	1.13	1.15	1.15	1.15	0.0
LDL-C	1.15	1.15	1.14	1.15	-0.9
UA	1.13	1.15	1.15	1.15	0.0
UA	1.13	1.13	1.16	1.13	2.7
β_2 -MG	1.16	1.16	1.15	1.16	-0.9
β_2 -MG	1.15	1.15	1.16	1.15	0.9

3 讨 论

目前,由于生化分析仪不断提高检测速度,加之大医院样本量的增加,使得全自动生化分析仪各测试项目间交叉污染的概率增加。有关全自动生化分析仪携带污染问题,无非是以下几个共用部分:样品针、试剂针、搅拌棒和比色杯。从血清磷测定的反应曲线可以看出,可排除样品针、R1 试剂针的干扰,因血清磷测定方法为单试剂法,故可排除 R2 试剂针影响。最后只剩下搅拌棒和比色杯的问题。本组吸光度的突然升高,时间在第 10~12 点之间,根据 Olympus 生化仪工作原理,此时正是 R2 搅拌棒进行混匀期间,故可以推定为 R2 搅拌棒的携带污染。将 R2 搅拌棒用 84 原液浸泡 30 min 处理后用去离子水冲洗干净,测定结果未出现吸光度突然上升的情况^[4]。

来自于试剂的携带污染检出必须根据不同仪器的工作原理设计不同的测试程序。本组先测定有可能的施污染项目,然后重复 4 次测血清磷浓度,其中第 1 次测得结果显示样本探针污染,第 3 次测定结果显示搅拌棒污染,第 4 次为对照;因 Olympus 仪器搅拌棒共有 3 组,故第 3 次测得的血清磷结果才与施污染项目测试共用 1 个搅拌棒;第 4 次测试由于试剂探针在加施污染项目试剂后已经加了 4 次的磷试剂,残留的施污染项目试剂很少,而第 4 次所使用的搅拌棒又与施污染项目不是同一组搅拌棒,因而可以将第 4 次测得的血清磷结果作为对照。

Olympus AU5421 全自动生化分析仪除电解质分析单元外还有两个测试单元,每一测试单元比色杯又分为内圈与外圈,因而将与磷在同一内圈里的 7 个测试项目作为施污染项目分别作了测试,发现只有 α -HBDH 及 UA 对磷测定有显著污染,分别达 57.6% 和 15.7%,这主要是由于这两个测试项目的试剂中含有磷成份(磷酸盐缓冲液)^[5-6],当搅拌棒由于表面磨损或吸附有纤维蛋白而清洗不干净时,就不可避免地导致携带污染的发生。此类清洗功能障碍早期很难发现,当仪器存在轻微清洗功能障碍时,加重这些测试项目试剂间交叉污染,导致检测结果出现较大偏差^[7-8]。

针对 Olympus AU5421 出现的搅拌棒携带污染问题,解决办法之一是加强仪器的日常维护与保养。该仪器要求每天要做 W1 清洗 1 次,每周要做 W2 清洗 1 次,且一周为酸性清洗液(稀盐酸),另一周为碱性清洗液(次氯酸钠),另外,1 个月左右需将样品针、试剂针、搅拌棒等共用部分卸下用 84 原液(次氯酸钠)浸泡半小时后用去离子水冲洗干净,如此才能达到清洗要求。若想彻底解决该已知项目对磷的污染,可将两者放在两个不同的测试单元或虽在同一测试单元,将两者分别放在外圈和内圈测定,以永久消除两者间携带污染,但是还必须经过一段时间的观察,以防又有新的测试项目产生对磷测定的携带污染。

参考文献

[1] 邱玲,程歆琦,刘茜,等. 自动生化分析仪携带污染源检出及处理[J]. 医学研究杂志, 2007, 36(6): 64-67.

[2] 罗梅. 全自动生化分析仪交叉污染的分析及排除[J]. 中国误诊学杂志, 2009, 9(4): 792-793.

[2] 顾光煜,张葵. 临床化学自动分析的携带污染与解除[J]. 临床检验杂志, 2007, 25(6): 401-403.

[3] 刘津. 试剂间交叉污染干扰无机磷测定的探讨[J]. 国际检验医学杂志, 2007, 28(3): 286-288.

[4] 沈振亚,李智,左枚军. Modular-PPI 全自动生化分析仪试剂携带污染及其解决措施[J]. 临床检验杂志, 2008, 26(3): 219-220.

[5] 林海川,梅玉峰. 全自动生化分析仪常用试剂间的相互干扰和应对措施[J]. 医学信息杂志, 2010, 12(9): 3815-3816.

[6] 于雷. 生化自动分析仪项目间试剂的交叉污染及其避免方法[J]. 临床检验杂志, 2003, 21(3): 168.

[7] 顾国宝,陈洁,李燕,等. 全自动生化仪使用中项目间交叉污染的探讨[J]. 上海医学检验杂志, 2002, 17(3): 176-177.

[8] 白俊玺,舒仁民,王家泗,等. C 反应蛋白与三酰甘油联合测定在监测全自动生化分析仪清洗功能中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(12): 1223-1224.

(收稿日期:2011-04-10)

• 经验交流 •

乳汁前处理对乙型肝炎病毒 DNA 检测结果的影响

李国玉, 陈 勇, 陈金弟, 李静梅

(福建省南平市九二医院检验科 353000)

摘要:目的 使用新的乳汁前处理方法对乳汁中的 HBV DNA 含量进行检测,提高乳汁中 HBV DNA 的检出率,以期评价该方法的准确性及有效性。方法 应用 Microcon YM 100 超滤柱法与传统的提取方法提取乳汁中的 DNA,通过实时荧光定量法检测 HBV DNA,比较两种方法对乳汁中 HBV DNA 的检出率。结果 在 50 例乳汁样本中,使用超滤柱法检出 HBV DNA 阳性的样本共 40 例,阳性率达到 80%,而使用传统方法共检出 30 例,阳性率只有 60%;比较两种方法检出 HBV DNA 的拷贝数, $P < 0.05$, 差异有统计学意义。结论 使用超滤柱法提取乳汁中的 HBV DNA 能提高乳汁中的 HBV 检出率,对于指导临床科学的母乳喂养提供可靠的实验室依据。

关键词: 肝炎病毒, 乙型; DNA; 乳汁

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2011. 07. 040

文献标识码: B

文章编号: 1673-4130(2011)07-0802-02

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)母婴传播的研究已受到医学界的关注,HBV 的垂直传播是多因素、多环节、多变异的复杂过程,而母乳喂养是引起 HBV 感染的重要因素。产妇乳汁 HBV DNA 定量检测有助于临床医生正确指导孕妇的喂养方式,产妇乳汁 HBV DNA 的检测虽有报道,但是其检测方法 & 检出率差异甚大,缺乏乳汁前处理方法的深入研究^[1]。本组拟用改良后乳汁前处理方法与传统的提取方法进行比较,分析乳汁中 HBV 的病毒载量,探讨乙型肝炎产妇乳汁的安全性。

1 资料与方法

1.1 一般资料 分娩 24 h 内的初乳采自 2009 年 1 月 1 日至 12 月 31 日在本院产科病房分娩的产妇,其血清 HBsAg 阳性,血清中 HBV DNA 拷贝数大于 1.0×10^3 copy/mL,谷草转氨酶及谷丙转氨酶均小于 40 U/L,共 50 例,平均年龄(23.2 ± 5.2)岁,平均孕龄(38.1 ± 1.2)周。用温水清洗乳头,然后轻轻挤出初乳约 3 mL,置于无菌塑料管中, -20 °C 保存。同时抽取静脉血 3 mL, 2 500 r/min 离心 10 min,离心半径 8 cm,取上清液保存于 -20 °C。

1.2 方法

1.2.1 传统的乳汁 HBV DNA 前处理方法 取产妇乳汁 3 mL, 2 500 r/min,离心 10 min,离心半径 8 cm,小心吸取出中层乳清液,然后再次 2 500 r/min 离心 10 min,离心半径 8 cm,将第 2 次离心后所得中层乳清置于 -20 °C 待检。

1.2.2 改良的乳汁 HBV DNA 前处理方法 500 μL 乳汁,加入 NET(50 mmol/L NaCl, 125 mmol/L EDTA, 50 mmol/Tris-

HCl, pH 为 7.6)缓冲液 100 μL, 70 °C 水浴 15 min,加入 RNase 3 μL,蛋白酶 K 10 μL, 56 °C 30 min, 20 000 g 离心 10 min,取水相 200 μL 加入 Microcon YM 100 纯化柱, 500 g 离心 15 min,反转纯化柱, 1 000 g 离心 5 min,将纯化浓缩后的样本置于 -20 °C 待检。以上两种方法所提取的乳汁 DNA 样本与血清样本均按深圳匹基生物公司提供的 HBV DNA 荧光定量检测试剂盒的操作步骤进行 HBV DNA 拷贝数检测,试剂盒的检出限度为 2.0×10^2 copy/mL。

2 结果

两种方法都检出 29 例乳汁样本,用 SPSS 13.0 软件包对 HBV 拷贝数结果进行统计学处理,经分析,差异有统计学意义 ($F = 4.96, P < 0.05$)。

3 讨论

中国是乙型肝炎高发区,人群 HBV 总感染率为 45% ~ 60%,其中近半数由母婴传播引起,因此产妇乳汁排毒率引起各界重视^[2]。由于母乳中含有多种营养成分和抗病毒物质,在发展中国家母乳喂养的婴儿常见疾病发病率和严重程度明显低于人工喂养儿。因此世界卫生组织(WHO)提出所有婴儿(母亲 HIV 感染时除外)都应该母乳喂养,包括对慢性 HBV 携带的母亲^[3]。中国 HBV 携带产妇占正常产妇的 25% 左右,母乳喂养的安全性值得重视。应用荧光定量 PCR 技术对产妇血清、乳汁进行 HBV DNA 载量检测。在中国约占婴幼儿感染的 1/3^[4],乙型肝炎产妇母乳喂养是乙型肝炎通过母婴传播的重要途径之一^[4]。关于 HBV 携带产妇能否进行母乳喂养,国际上一直存在争议,在实施乙型肝炎疫苗接种前, Beasley