

ELISA 法有 4 例为弱阳性,显色很淡,其吸光度值与 cut-off 值相近。另有 3 例为阴性,吸光度值较低,但经稀释后显示阳性,原因可能是因为 HBsAg 含量过高,与包被的抗体含量相比过剩,造成抗原抗体反应的后带现象,即通常所说的“钩状效应”^[6]。这就表明,采用胶体金法可有效地防止因“钩状效应”造成的 HBsAg 假阴性的现象,与李曼等^[7]的报道相符。导致反应孔吸光度值与 cut-off 值接近而造成结果时阴时阳的因素是多方面的,笔者归纳主要有以下几方面的原因:(1)试剂的预备不够充分。在日常操作中发现,有些实验室操作人员将试剂盒从冰箱中取出来后,还没和室温平衡就直接加样反应,从而导致有效反应时间缩短,出现某些弱阳性标本检测假阴性的结果。为了避免这种因素造成的干扰,笔者建议试剂盒从冰箱中取出后应与室温平衡 30~60 min 再进行测定,以便获得更可靠的结果。(2)标本溶血、被细菌污染、保存时间过长、凝固不全以及血清某些因子过量存在曾被认为是形成这一现象的主要原因^[8-9]。因血红蛋白中含有亚铁血红素有类过氧化物酶的活性,在以辣根过氧化物酶(HRP)为标志的 ELISA 测定中,很容易吸附于固相而与 HRP 底物反应显色造成假阳性。因此,一般血液标本采集后不能用力振荡,以免发生溶血,对于本身溶血的标本应建议重新抽血或在标本备注栏注明“标本溶血”或相关说明性的文字。很多细菌都有类过氧化物酶的活性,若标本被细菌污染,可造成结果假阳性,故建议使用新鲜标本进行检测,若不能及时测定,可将标本收集在无菌试管内,3~5 d 内检测的标本可置于 4 ℃冰箱中,1 个月内检测的标本可置于一 20 ℃冰箱中,3 个月以上检测的标本则应置于一 70 ℃冰箱中。但标本在冰箱中保存过久,血清中 IgG 可聚合成多聚体,在用间接法测定时会致本底过深,甚至造成假阴性;对于反复冻融的标本,因产生机械剪切力而破坏蛋白质分子结构,易引起结果假阴性。标本在凝固不全时血清中含有纤维蛋白原,可使结果出现假阳性,因此,应待血液充分凝固后再离心分离血清或使用含有适当抗凝剂的采血管。(3)操作中的因素,包括加标本、样品稀释液、酶液、底物 A、B 液时滴加液量不够或过多,洗板不彻底造成非特异性反应物残留引起显色假阳性,洗液浓度不够或静置时间不够造成所谓的“花板”,温育时间短及温育温度高低对反应及显色结果的影响等。(4)结果的判定,按说明书规定结果应在 15 min 内读取,若延长读取会

• 检验技术与方法 •

使结果出现异常而干扰结果判定。因此,在日常实际操作中应加强质量管理,增强责任心,尽量避免或减少影响 ELISA 结果的因素,为临床疾病的诊断和预后提供准确、可靠的依据。

总的来看,ELISA 法具有敏感度高、特异性好、操作简便、批量操作等优点,但其步骤繁多,易受人为等诸多因素干扰。胶体金法具有检测快速、操作简便、可单份操作、步骤单一、不需借助仪器设备、不易产生交叉污染等优点^[10],但其敏感度较 ELISA 法低。2 种方法各有其优缺点,各实验室可根据自身情况选用合适的方法,但应注意的是 2 种方法不能交替使用,否则 HBsAg 浓度较低时或因“钩状效应”造成 2 次不同的结果而误导临床,引起医疗纠纷。

参考文献

[1] 叶维法,钟振义. 肝炎学大典[M]. 天津:天津科学技术出版社, 1996:463-515.

[2] 陈瀑,康红. 胶体金免疫层析法检测乙型肝炎的评价[J]. 临床输血与检验,2003,5(1):30-31.

[3] 曾章新,刘文星,乐忠勇,等. 胶体金免疫层析法检测乙型肝炎表面抗原的评价[J]. 中华医学检验杂志,1999,22(6):327-329.

[4] 周继文,戎广亚,杨守纯,等. 胶体金免疫层析法检测乙型肝炎病毒表面抗原[J]. 中华检验医学杂志,1998,21(1):30-32.

[5] 陶其敏. 如何看待病毒性肝炎的基因诊断[J]. 中华检验医学杂志,2002,25(2):69-70.

[6] 陈华根,刘冰. 规范使用“带现象”和“钩状效应”概念[J]. 中国输血杂志,2006,19(3):218.

[7] 李曼,陈正徐,陈玉梅,等. 一步法测 HBsAg 产生钩状效应的原因分析及对策探讨[J]. 齐鲁医学检验,2004,15(6):64.

[8] 陈保民. 酶免疫技术 HBsAg 中试验操作个体差异及可疑区域的界定[J]. 郑州大学学报:医学版,2007,42(5):904-905.

[9] 钱厚民,赵江燕,张燕. 应重视 ELISA 检测 HBsAg 灰区范围内样品的复检[J]. 上海医学检验杂志,2002,17(3):156-157.

[10] Beggs M,Novotny M,Sampedro S,et al. A self-performing chromatographic immunoassay for the qualitative determination of human chorionicgonadotrophic (HCG) in urine and serum[J]. Clin Chem,1990,36:1084-1085.

(收稿日期:2011-05-20)

血液标本中葡萄糖稳定性的动态观察

史连义,张继领,谢 卫,刘继勇,杨保昌,徐 伟
(中国石油天然气集团公司中心医院检验科,河北廊坊 065000)

摘要:目的 动态观测血液标本中葡萄糖的稳定性,为葡萄糖测定标本的采集及处理提供实验依据。方法 用 NaF 管、肝素钠管、凝胶促凝管采集血样在室温或 4 ℃放置不同时间后分离血浆(清)测定葡萄糖。血清标本在室温放置不同时间后测定葡萄糖,观察其变化规律。结果 室温下肝素钠管中葡萄糖浓度随时间延长不断下降,NaF 管中葡萄糖浓度在前 90 min 下降与肝素钠管中一致,90~180 min 葡萄糖浓度保持稳定。凝胶促凝管中葡萄糖浓度在前 60 min 下降与在肝素管及 NaF 管中一致,但 60~150 min 葡萄糖浓度下降较前两管慢。血清标本在室温下至少保持 3 h 稳定。凝胶促凝管在 4 ℃放置葡萄糖浓度至少保持 3 h 不变。结论 防止血液中葡萄糖浓度降低最有效的途径不是使用 NaF 管采血而是将血样低温保存或及时分离血清(浆)。

关键词:葡萄糖; 稳定性; 标本采集

DOI:10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2011. 16. 037 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2011)16-1864-03

做什么检验项目用什么颜色的真空采血管采血,是每个临床护士及检验人员应该掌握的基本知识。灰色帽的采血管含有 NaF(一种弱效抗凝剂,有良好的防止血糖降解作用,是血糖检测的优良保存剂),是中华人民共和国卫生部推荐使用的检测血糖的专用采血管^[1]。但在临床工作中如果检验肝功能等生化项目时再单独采一管血用于血糖的检验,一方面增加了护

士及检验人员的工作量,同时增加了患者的痛苦及费用。为此笔者设计实验观察不同采血管采集血液后不同存放状态葡萄糖随时间的分解情况,为葡萄糖测定标本的采集与处理方法提供实验依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取自愿参加本研究的本院员工或家属的血液标本,受试者既往有糖尿病史。

1.2 仪器与试剂 采用 Olympus AU2700 全自动生化分析仪,北京 Leadman 公司生产的葡萄糖测定试剂盒。真空采血管:北京积水创格公司生产葡萄糖测定专用灰帽管(NaF 草酸钾抗凝,以下称 NaF 管)、绿帽血浆管(肝素钠抗凝,以下称肝素钠管)、黄帽带惰性凝胶的促凝管(含促凝剂及分离胶,以下称凝胶管)。

1.3 方法

1.3.1 首先调试仪器做葡萄糖测定的重复性试验,连测 10 个标本计算 CV<1.5%。

1.3.2 选取经预实验检测其葡萄糖水平为 6.0~8.0 mmol/L,红细胞(RBC)比容为 0.45~0.50 的 5 名志愿者分 5 d 进行试验,每日室温在 22~25 ℃之间。

1.3.3 标本采集方法 每日以 1 名志愿者为研究对象做如下实验:每名志愿者静脉采血 13 管,其中肝素钠抗凝血 1 管(A),NaF 抗凝血 1 管(B),凝胶管 11 管(C~M)。A~J 放置于室温,K~M 管立即置于 4 ℃冰水浴中待处理。A、B、C 各采集 3 mL,其余各管采集 1.5 mL,共约 24 mL。

1.3.4 标本处理及测定 采血后肝素钠管 A、NaF 管 B 以及凝胶管 C,立即离心使血浆(清)与细胞分离。其中 A、B 管立即在 AU2700 急诊台上(4 ℃)连续测定 3 次取平均值,作为 A、B 管的即刻测定结果。C 管于室温 20 min 后再次离心分离出血清后测定 3 次取平均值作为凝胶管的即刻测定结果。A、B 管检测完成后立即取出轻轻颠倒混匀形成全血分别在室温放置 20、40、60、90、120、150、180 min 后离心检测,以模拟观察肝素钠及 NaF 抗凝全血室温放置不同时间分离血浆时对葡萄糖检测的影响。D、E、F、G、J 管分别室温放置 20、40、60、90、120、150、180 min 后离心测定观察凝胶管全血室温放置不同时间分离血清对葡萄糖检测的影响。K、L、M 分别于冰水浴中放置 60、120、180 min 后离心检测以观察凝胶管于冰水浴中放置不同时间分离血清对葡萄糖检测的影响。C 管分离血清后室温放置分别于 60、120、180 min 后检测,以观察分离血清后凝胶管保存血清室温放置不同时间对葡萄糖检测的影响。

1.4 统计学处理 数据以中位数表示,采用秩和检验(Wilcoxon 符号秩检验)作两两比较。

2 结果

各采血管不同放置时间及不同放置温度下葡萄糖检测结果(mmol/L)见表 1、图 1。由图 1、表 1 可以看出,凝胶管血清分离后室温放置与凝胶管 4 ℃放置 180 min 分离血清时结果差异无统计学意义($Z=0.272, P=0.785$)。肝素管采集的血样于室温放置随时间推移,葡萄糖浓度不断降解。直到 180 min 葡萄糖由 7.32 mmol/L 下降到 5.88 mmol/L,下降达 19.67%,平均每小时 6.55%。经秩和检验各时间点与前一时间点比较差异有统计学意义($Z=2.023, P=0.043$)。凝胶管采集的血样于室温放置随时间推移,葡萄糖浓度不断降解。直到 180 min 葡萄糖由 7.30 mmol/L 下降到 6.45 mmol/L,下降达 11.64%,平均每小时 3.88%,较肝素管葡萄糖降解速度缓慢。经秩和检验各时间点与前一时间点比较差异有统计学意义($Z=2.023, P=0.043$)。NaF 管采集的血样室温放置时葡萄糖浓度的下降在前 90 min 内与肝素管相似,由 7.3 mmol/L

下降到 6.67 mmol/L,下降达 8.6%,平均每小时 5.75%。经秩和检验 40、60、90 min 结果与 0 min 比较差异有统计学意义($Z=2.023, P=0.043$)。而在 90~180 min 葡萄糖浓度则不再下降,90、120、150、180 min 结果比较差异无统计学意义($Z=0.272, P=0.785$)。3 种管在 60 min 内葡萄糖降解有相似的下降程度,0、20、40、60 min 两两比较差异无统计学意义($Z=0.272, P=0.785$)。在 60~150 min 凝胶管中葡萄糖浓度下降最少,优于肝素管及 NaF 管。在 150~180 min NaF 管中的葡萄糖浓度下降最少,优于肝素及凝胶管。

表 1 各采血管不同放置时间及不同放置温度下葡萄糖检测结果(mmol/L)

采血管种类	放置温度	放置时间(min)							
		0	20	40	60	90	120	150	180
肝素管	室温	7.3	7.24	7.12	7.05	6.66	6.42	6.25	5.88
NaF 管	室温	7.3	7.25	7.09	7.04	6.67	6.62	6.6	6.58
凝胶管	室温	7.3	7.24	7.18	7.01	6.91	6.76	6.57	6.45
凝胶管	4 ℃水浴	7.3	—	—	7.32	—	7.32	—	7.3
血清	室温	7.3	—	—	7.34	—	7.36	—	7.43

—:无数据。

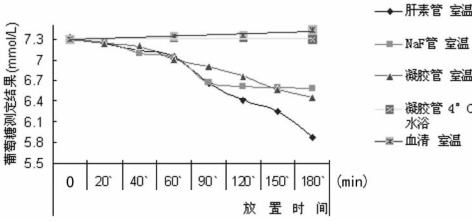


图 1 各采血管不同放置温度及时间葡萄糖的测定结果

3 讨论

血液葡萄糖水平的检测是糖尿病诊断和治疗监测的重要指标,因此实验室对葡萄糖的准确检测至关重要。葡萄糖虽然是一种分子结构简单的物质,但准确检测却不是一件容易的事。其误差主要来源于 3 个方面:标本采集时间、检测方法的性能、离体后葡萄糖的降解,其中最重要的影响因素是血液离体后葡萄糖的降解[2-3]。

为有效地解决这一问题,专业的真空采血管厂商推出了 NaF 抗凝真空采血管,专门用于测定葡萄糖。标本采集后,NaF 可以迅速地进入 RBC 内,抑制葡萄糖降解过程中的烯醇酶的活性从而使葡萄糖降解的路径被阻断,阻止葡萄糖的分解。然而 NaF 抑制烯醇酶的活性后,位于整个降解过程中烯醇酶以后的反应被终止而位于烯醇酶上游的反应在一定时间内仍在继续,Mikesh 和 Bruns[3]使用美国 BD 公司的 NaF 管做实验证实了这一点。他发现在采血后的前 90 min 内 NaF 不能有效地阻止葡萄糖的降解,葡萄糖浓度较即刻测定结果不断下降,而此时乳酸的生成不再增加。90 min 后,葡萄糖浓度不再下降,乳酸浓度也保持不变。本实验中,使用中日合资积水创格的 NaF 管也得出了一致的结论。因此使用 NaF 管在 90 min 之内是不能有效阻止葡萄糖降解的。

经本实验证实,无论使用 NaF 管、肝素管还是凝胶管,在室温下 60 min 之内分离血清(浆),在 3 种管中葡萄糖的降解程度是一样的,使用哪一种管采血对葡萄糖浓度检测是一样的。若在 60~150 min 分离血清(浆),凝胶管中葡萄糖浓度下降最少,优于肝素钠管及 NaF 管。只有在 150~180 min 分离血清(浆),NaF 管中的葡萄糖浓度下降最少,优于肝素钠管及凝胶管。凝胶管血清分离后室温放置,葡萄糖浓度在 180 min 内保持不变。因此及时的血清(浆)分离可以有效抑制葡萄糖

的降解,是保证葡萄糖稳定的简单、有效的方法。目前,真空采血管的使用使血清的及时分离成为可能,一般优质的真空采血管在 5~15 min 之内即可分离血清^[4],完全可以满足临床检验的需要,因此测定血糖时可以不单独使用 NaF 管采血,而是和其他生化检验项目共用 1 管血即可。

据北京协和医院统计^[5],在生化检验的临床实践中,从标本采集到分离血清平均需要 131.4 min,尤其住院患者血样需时较长,甚至达到 3~4 h。这段时间葡萄糖浓度下降所造成的误差是值得考虑的,尤其对于葡萄糖结果处于诊断临界点上的标本。正如本实验中一个葡萄糖浓度为 7.3 mmol/L 的标本如果被放置室温 2 h 甚至 3 h 其结果会下降至 6.4 mmol/L 或 5.88 mmol/L,按照 WHO 1999 年关于糖尿病诊断标准,那么该患者可能由糖尿病诊断成立改为做进一步的糖耐量实验甚至被认为血糖正常放弃进一步检测及检查,而导致误诊。《临床化学检验血液标本的收集与处理》规定要求 2 h 之内分离血清(浆)的要求对于血糖的检测也不太严格^[6]。

因此,及时的血清(浆)分离减少葡萄糖的降解的前提是优化检验流程,缩短标本的转运时间,对于不能及时送检的标本应低温保存或用凝胶管就地进行血清分离然后转运^[7]。在检验报告中注明标本采集、收到及检测报告时间,对更客观的评

• 检验技术与方法 •

价结果也是有帮助的。

参考文献

[1] 中华人民共和国卫生部. WS/T 224-2002 真空采血管及其添加剂[S]. 北京:中华人民共和国卫生部,2002.

[2] Gambino R. Glucose: a simple molecule that is not simple to quantify[J]. Clin Chem, 2007, 53(12): 2040-2041.

[3] Mikesch LM, Bruns DE. Stabilization of glucose in blood specimens: mechanism of delay in fluoride inhibition of glycolysis[J]. Clin Chem, 2008, 54(5): 930-932.

[4] 汪嘉, 李智, 左玫, 等. 7 种真空促凝采血管对 15 种生化指标检测结果的影响[J]. 检验医学, 2005, 20(4): 344-346.

[5] 国秀芝, 邱玲. 临床生化检验流程调查与优化管理[J]. 现代检验医学杂志, 2007, 4(22): 100-101.

[6] 中华人民共和国卫生部. WS/T 225-2002 临床化学检验血液标本的收集与处理[S]. 北京:中华人民共和国卫生部, 2002.

[7] 郭龙华, 万泽名, 陈茶, 等. 惰性分离胶管采集和保存样品在血糖检测中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(1): 69-70.

(收稿日期: 2011-05-09)

联合应用干化学法与显微镜法检测尿液红细胞和白细胞的准确性探讨

孙廷河, 张连胜, 丁 芳
(河南省郑州市第三人民医院检验科 450000)

摘要:目的 探讨联合应用干化学法与显微镜法检测尿液红细胞(RBC)和白细胞(WBC)以提高结果准确性。为临床提供最可靠的诊断依据。**方法** 收集 500 例尿液标本,采用干化学法和显微镜法检测尿液中的 RBC 及 WBC 数量并对结果进行比较和分析。**结果** 500 例尿液干化学检测 RBC 阳性 180 例中,经显微镜法检测阳性 128 例,阴性 52 例。RBC 阴性 320 例中,经显微镜法检测阳性 20 例,阴性 300 例。2 种方法阳性符合率 71%,阴性符合率 94%。干化学法检测 WBC 阳性 200 例中,经显微镜检测阳性 190 例,阴性 10 例。WBC 阴性 300 例中经显微镜法检测阳性 55 例,阴性 245 例。2 种方法阳性符合率 95%,阴性符合率 82%,以显微镜法检查为标准,干化学法检查 WBC 假阳性率为 28%,假阴性率为 6.2%,干化学法比显微镜法检查的阳性率偏高。而干化学法检查 RBC 假阳性率 5%,假阴性率 11.6%,干化学法比显微镜法检查阳性率偏低。**结论** 在做尿液分析时,一定要标准化、规范化做好干化学法与显微镜法的联合应用。2 种方法不能互相代替,只有互相补充,才能提高尿液的检测效率及准确性。

关键词:显微镜检查; 红细胞; 白细胞; 尿分析; 干化学法

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.16.038 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2011)16-1866-02

尿液分析是临床常用的检验技术之一,也是诊断泌尿系统疾病的重要指标之一,能为临床诊断和治疗疾病提供重要依据^[1]。目前干化学尿液分析仪已被广泛应用于各大实验室,这种仪器具有操作简单、快速等优点,能大大提高工作效率。由于这种方法受到一些因素影响,可造成结果出现假阳性或假阴性,尤其是尿红细胞(RBC)和白细胞(WBC)。显微镜检查法是检测尿 RBC 和 WBC 的标准方法^[2],但是操作较繁琐,若是将 2 种方法综合运用,既能提高检测效率,又能提高结果的准确度。笔者通过 500 例尿液联合应用干化学法与显微镜法检测,对其 RBC 和 WBC 的结果进行探讨。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集本院临床各科室住院患者晨尿标本及门诊患者随机尿液,其中男 220 例,女 280 例。

1.2 仪器与试剂 采用日本 Olympus 双目显微镜,烟台宝威生物技术有限公司尿液 10 项分析仪及尿干化学试带,具有抗维生素 C(Vc)干扰能力。

1.3 方法 采用干化学法将被检晨尿 10 mL 置于洁净试管

中,将试带充分浸入尿液中(1 s)取出于滤纸上拭去多余尿液置分析仪上测定,并打印结果。将上述尿液标本混匀,以 1 500 r/min 离心 5 min,弃去上清液留 0.2 mL 尿液,混匀在高倍镜下连续计 10 个高倍视野(HP)中的 RBC 和 WBC,最低至最高值报告结果。

1.4 统计学处理 尿液分析仪结果以一、+/-、1+、2+、3+ 表示。显微镜法参考范围 RBC<(0~3)/HP, WBC<(0~5)/HP,以 RBC≥3/HP 为阳性, WBC≥5/HP 为阳性^[3]。

2 结 果

2.1 500 例尿液中 RBC 干化学法和显微镜法检测结果 500 例尿液 RBC 干化学法阳性 180 例中,显微镜法检查阳性 128 例,阴性 52 例。320 例 RBC 阴性中显微镜法检查阳性 20 例,阴性 300 例。2 种方法阳性符合率 71%,阴性符合率 94%,以显微法为标准。干化学分析法检查 RBC 假阳性率为 28%,假阴性率为 6.2%,干化学分析法比显微镜法检查的阳性率明显偏高,见表 1。

2.2 500 例尿液中 WBC 干化学法和显微镜法检测结果 500