

对结果无影响,在 15 mmol/L 可使结果偏高 8%~10%,如更高,应做适当稀释后再测定。

2.8.4 常用 5 种抗凝剂 肝素、EDTA-Na₂、EDTA-K₂、枸橼酸钠和草酸钠在常用浓度下对血清唾液酸结果几乎无影响。

2.9 正常参考值测定 用本方法测定 200 例 30~70 岁经体检无肾脏、肝脏、肺部、心脑血管疾病,血清肝、肾功能正常的健康人群。空腹采血,置于不含添加剂的洁净玻璃管内,待血液凝固后分离血清,2 h 内完成测定,血清唾液酸正常参考值为 450~850 mg/L。

3 临床应用

3.1 急性白血病 3 例,血清唾液酸浓度在 1 540~4 268 mg/L;肝癌患者 5 例,血清唾液酸浓度在 965~3 842 mg/L;肺癌患者 4 例,血清唾液酸浓度在 897~33 678 mg/L;乳腺癌患者 9 例,血清唾液酸浓度在 1 023~2 152 mg/L;胃癌患者 6 例,血清唾液酸浓度在 912~2 830 mg/L;大肠癌患者 5 例,血清唾液酸浓度在 874~1 925 mg/L;其他癌症患者 4 例,血清唾液酸浓度在 941~1 506 mg/L。

3.2 其他疾病 29 例,尿路结石患者 15 例,血清唾液酸浓度稍有增高,在 764~1 045 mg/L;前列腺肥大患者 6 例,血清唾液酸浓度在 715~982 mg/L;急性肾炎患者 8 例,血清唾液酸浓度在 653~925 mg/L。

4 讨论

4.1 本方法选择灵敏度较高的色原系统,是提高其检测灵敏度的有效途径,MEHA、4-AAP 色原无毒性,显色稳定性好,结果不受一般浓度的黄疸、溶血的物理性干扰。为了扩大线性范围,必须适当降低灵敏度,将比色波长移至 560 nm。

4.2 血清唾液酸是细胞膜糖蛋白的重要组成部分,与生物体的许多生物学功能有关,且与细胞恶变、癌转移、浸润、失去接触性抑制、细胞黏附性降低以及肿瘤抗原性密切相关。细胞在代谢异常时,唾液酸脱落进入体液,使血清中唾液酸升高,主要见于急性炎症反应和结核病妊娠等^[2]。本方法测定血清唾液酸浓度,可作为癌症、肿瘤诊断的辅助性指标和疗效观察指标,在肿瘤广泛扩散时血清唾液酸升高,也可作为肿瘤复发的一个指标,与文献报道一致^[3]。当炎症消除后或病情好转,血清唾液酸浓度基本正常^[4]。血清唾液酸浓度与肿瘤特异性生长因

子有一定的相关性^[5]。

4.3 丙酮酸是本方法反应中重要的中间产物,因此,若在样品中含有过多的丙酮酸会对测定造成干扰,但在健康者血清中的丙酮酸浓度一般小于 0.1 mmol/L,这只对测定造成较小的误差。由于正常血清中含有乳酸脱氢酶,它会把丙酮酸变为乳酸,这就更减小了误差,所以在常规测定时不需要做样品空白。

4.4 本方法选择的最佳试剂条件,特别是缓冲液的浓度、种类及 pH 值,对本法起着非常重要的作用。在反应液中加入抗坏血酸氧化酶,破坏维生素 C,避免还原性物质对结果的影响,加入 TritonX-100 非离子性表面活性剂是防止显色液发生浑浊,保证反应液的透明度^[6]。底物和酶的浓度都达到饱和,所用的 pH 值在各种酶的最适范围,这样可使反应时间缩至最短。

4.5 本方法主要用于血清中的唾液酸测定,尿中的唾液酸不能测定,因为尿中有丙酮酸氧化酶的抑制物。

总之,应用丙酮酸氧化酶建立的一种新的酶法测定血清唾液酸的方法,具有快速准确、操作简便、微量、灵敏、线性范围宽和结果稳定等优点,适用于全自动、半自动生化分析仪,更适应于中小型医院,有较大的推广使用价值。

参考文献

[1] 王秀钦,刘晓兰.血清唾液酸测定对恶性肿瘤的诊断价值[J].肿瘤防治研究,1994,24(5):337.

[2] Brenne AT, Baade RT, Waage A, et al. Interleukin-21 is a growth and survival factor for human myeloma cells[J]. Blood, 2002, 99(10):3756

[3] 徐新波,杜江东,寇新明.血清唾液酸作为肿瘤标志物的检测及临床应用[J].国际检验医学杂志,2010,31(2):182-183.

[4] 陈建仙,王能智,欧平.唾液酸测定在恶性肿瘤与良性疾病诊疗上的应用[J].福建医药杂志,1995,17(3):146.

[5] 毛志福,金化民.血清唾液酸的诊断作用与临床意义[J].国外医学:外科学分册,1995,22(4):222.

[6] 唐先平,秦媛媛,宋蓉,等.血清尿素丙酮酸氧化酶测定新方法的研究及应用[J].国际检验医学杂志,2008,29(9):792-793.

(收稿日期:2011-05-11)

• 检验技术与方法 •

固相免疫吸附法在 ABO 正反定型/RhD 血型检测中的应用

史立英¹,杨文冲²,于红¹,苏式敏¹,王超²,童军³,李勇³

(1. 吉林省肿瘤医院,长春 130012;2. 长春博德生物技术有限责任公司 130012;

3. 长春生物制品研究所 130062)

摘要:目的 探讨固相免疫吸附法在 ABO 正反定型/RhD 血型检测中的应用。方法 通过应用新鲜红细胞试管法、微柱凝胶法及固相免疫吸附法同时测定 557 例临床样本的 ABO 正反定型/RhD 血型,对检测结果进行分析,对固相免疫吸附法进行临床评价。**结果** 固相免疫吸附法与试管法的符合率达 100%,与微柱凝胶法的符合率也达 100%。**结论** 固相免疫吸附法可以用于 ABO 正反定型/RhD 血型的测定。

关键词:血型抗原; 固相免疫吸附法; 试管法; 微柱凝胶法

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.19.033

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)19-2238-03

为了保障输血安全,《输血技术规范》中明确规定要检查受血者和供血者 ABO 血型正反定型及患者 Rh D 血型^[1]。为此,本组开发出可以用于 ABO/RhD 血型检测的新方法——固相免疫吸附法,应用的抗原为分子化抗原及处理的红细胞进行

正反定型检测^[2]。现将该新型方法与新鲜红细胞试管法、微柱凝胶法的比较结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 随机抽取 557 例患者抗凝全血,其中男 207

例,女 350 例,年龄 7~90 岁,平均 52.8 岁。

1.2 仪器与试剂 离心机为长春博研科学仪器有限责任公司和 Diana 公司产品。抗 A/B 单克隆抗体血型定型试剂、ABO 血型反定型检测试剂盒(人红细胞)、ABO 正反定型/RhD 血型定型试剂(固相免疫吸附法)由长春博德生物技术有限责任公司研制;抗 D 单克隆抗体血型定型试剂为德国 Biotest 公司产品;微柱凝胶血型检测卡由 Diana 公司提供。

1.3 方法

1.3.1 新鲜红细胞试管法^[3] 按抗 A/B 单克隆抗体血型定型试剂、抗 D 单克隆抗体血型定型试剂、ABO 血型反定型检测试剂盒(人红细胞)使用说明书进行操作。观察结果,根据反应格局判定血型。

1.3.2 微柱凝胶法 按微柱凝胶血型检测卡使用说明书中试管法进行操作。观察结果,根据反应格局判定血型。

1.3.3 固相免疫吸附法^[3] 按 ABO 正反定型/RhD 血型定型试剂(固相免疫吸附法)使用说明书进行操作。观察结果,根据反应格局判定血型。

1.3.4 反定型反应格局 见表 1。

1.4 统计学处理 将固相免疫吸附法结果与对比方法的结果

进行比较,计算阳、阴性一致性百分比及总一致性百分比。

表 1 反定型反应格局

血型	RhD 抗原 抗-D	ABO 血型				
		正定型		反定型		
		抗-A	抗-B	A	B	O
A/D+	+	+	-	-	+	-
B/D+	+	-	+	+	-	-
AB/D+	+	+	+	-	-	-
O/D+	+	-	-	+	+	-
A/D-	-	+	-	-	+	-
B/D-	-	-	+	+	-	-
AB/D-	-	+	+	-	-	-
O/D-	-	-	-	+	+	-

2 结果

通过对 557 例临床样本的检测结果进行统计学分析,固相免疫吸附法与试管法的符合率达 100%,与微柱凝胶法的符合率也达 100%,见表 2~4。

表 2 计算方法

方法	A/D+型	B/D+型	O/D+型	AB/D+型	A/D-型	B/D-型	O/D-型	AB/D-型	总计
对比方法	a	b	c	d	e	f	g	h	a+b+c+d+e+f+g+h
固相免疫吸附法	i	j	k	l	m	n	o	p	i+j+k+l+m+n+o+p
符合率	a/i×100%	b/j×100%	c/k×100%	d/l×100%	e/m×100%	f/n×100%	g/o×100%	h/p×100%	(a+b+c+d+e+f+g+h)/ (i+j+k+l+m+n+o+p)×100%

表 3 固相免疫吸附法与试管法检测结果的比较

方法	A/D+型	B/D+型	O/D+型	AB/D+型	A/D-型	O/D-型	总计
新鲜红细胞试管法	159	182	154	59	1	2	557
固相免疫吸附法	159	182	154	59	1	2	557
符合率(%)	100	100	100	100	100	100	100

表 4 固相免疫吸附法与微柱凝胶法检测结果的比较

方法	A/D+型	B/D+型	O/D+型	AB/D+型	A/D-型	O/D-型	总计
微柱凝胶法	159	182	154	59	1	2	557
固相免疫吸附法	159	182	154	59	1	2	557
符合率(%)	100	100	100	100	100	100	100

3 讨论

卫生部 2000 年发布的文件《输血技术规范》明确要求临床每一位献血人员和患者都要进行 ABO 血型正反定型和 RhD 血型的检测。

目前临床常规检测方法中,试管法是血型检测的金标准,但操作复杂,不易自动化、标准化;微柱凝胶法操作简单,结果准确可靠,易于判读,灵敏度高,所需样本量少,但红细胞浓度过低或过高且离心不彻底、血清中含纤维蛋白出现细胞“凝块”、细菌污染等,可能导致假阴性或假阳性,并且价格昂贵。

目前反定型检测使用新鲜红细胞,由于其易溶血、保存期短等原因,试剂质量难以保证,由此导致 ABO 血型反定型检测至今未达到规范化、标准化。

固相免疫吸附法具有固相免疫吸附测定技术和凝集反应的特点,为一项高特异性、高敏感性、简便易行的检测技术。它在国外已得到广泛应用,而国内报道甚少^[4]。本组研制的 ABO 正反定型/RhD 血型检测试剂盒(固相免疫吸附法),将固相免疫吸附技术用于 ABO 正反定型/RhD 血型检测,所用抗

原为分子化抗原及处理的红细胞,可长期保存并具有抗原性,该试剂的优点具有灵敏度高、操作简便、结果可靠、易于判读等优点;解决了反定型试剂红细胞的长期保存问题;反定型检测用红细胞既可以用处理的,也可用新鲜的为指示细胞;检测程序和结果判读易于标准化、自动化,重复性好,使用灵活,既适用于少量,又适用于批量检测。

通过对检测结果进行分析,新建立的固相免疫吸附法将在 ABO 正反定型/RhD 血型检测中得到广泛应用。

参考文献

[1] 中华人民共和国卫生部. 临床输血技术规范[P]. 2000 年.
 [2] Judd JB, John W. New blood bank technologies[J]. Clin Laborat Sci, 1998, 24(16): 23-28.
 [3] 李勇, 马学严. 实用血液免疫学[M]. 北京: 科学出版社, 2006: 131.
 [4] Desmonts G, Naot Y, Jack SR. Immunoglobulin mimmosorbent agglutination assay for diagnosis of infectious diseases; diagnosis

of acute congenital and acquired Toxoplasma infection[J]. J Clin Microbiol, 1981, 14(5): 486-491.

(收稿日期: 2011-08-28)

• 检验技术与方法 •

免疫凝集法检测糖化血红蛋白的应用评价

吴晓虹, 沈雄文

(中国人民解放军南京军区杭州疗养院检验科, 杭州 310007)

摘要:目的 了解免疫凝集法检测糖化血红蛋白试剂盒测定结果的准确性、可靠性, 并对其方法进行方法学评价, 为临床在分析不同方法检测糖化血红蛋白结果时提供参考。方法 参照美国临床实验室标准化委员会的方法学评价方案, 与美国 BIO-RAD VARIANT II 糖化血红蛋白分析仪检测 HbA1c(%) 的结果进行对比, 同时监测放置时间对其结果的影响。结果 免疫凝集法线性良好, 稀释变异可接受, 线性范围为 0~5.2 g/L, 最低可检出限为 0.074 g/L。日间 CV=4.33%, 批内 CV=3.02%, 批间 CV=3.39%, 总 CV=4.51%。血浆中高浓度胆红素、三酰甘油和尿素干扰 HbA1c 的检测。全血标本 4℃ 条件下放置 2 周后结果稳定; 溶血标本 4℃ 条件下放置 6 个月结果稳定。结论 免疫凝集法检测 HbA1c 的线性范围、稀释变异均符合临床检测要求, 最低可检出限为 0.074 g/L, 不精密度小于 5%。与美国 BIO-RAD VARIANT II 糖化血红蛋白分析仪检测结果比较, 差异无统计学意义。可采用在 4℃ 保存的溶血标本作为室内质控品。

关键词: 质量控制; 糖化血红蛋白; 免疫凝集法; 方法比对

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.19.034

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)19-2240-02

糖尿病是一种全球性疾病, 在很多国家和地区的患者数逐年递增, 预计到 2025 年全世界糖尿病患者将达 3 亿人^[1-2]。糖化血红蛋白(glycosylated hemoglobin, HbA1c)检测可反映机体 1~2 个月前的平均血糖水平, 故在糖尿病的监测、治疗方面具有重要意义, 有助于从整体上准确地观察病情, 了解治疗效果, 受到普遍重视^[3]。HbA1c 的测定方法有手工微柱法、金标法、高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)和免疫凝集法等。本组采用北京利德曼公司的糖化血红蛋白测定试剂盒检测 HbA1c, 了解该试剂盒测定结果的准确性、可靠性, 并对其方法进行方法学评价, 旨在为临床分析不同方法检测 HbA1c 提供参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料

1.1.1 健康对照组 经该院体检的无高血压、糖尿病、高脂血症、贫血等疾病的健康者, 男 20 例, 平均年龄 33.8 岁; 女 20 例, 平均年龄 31.2 岁。采集空腹和餐后半小时静脉血, EDTA-K₂ 抗凝, 密闭室温保存。

1.1.2 病理组 2 型糖尿病患者 57 例, 采集空腹静脉血, EDTA-K₂ 抗凝, 密闭室温保存, 4 h 内完成检测。

1.1.3 高胆红素血清 收集黄疸患者及新生儿黄疸患者血清, 混合后检测总胆红素及直接胆红素, 共 4 次, 取均值。

1.1.4 高三酰甘油血清 收集高脂血症患者血清, 混合后检测总胆红素及直接胆红素, 共 4 次, 取均值。

1.2 仪器与试剂 美国 Abbott 公司 AEROSSET 全自动生化分析仪; 美国 BIO-RAD VARIANT II 糖化血红蛋白分析仪。北京利德曼公司提供的免疫凝集法 HbA1c 试剂盒(批号: 70711G211), 包括溶血剂、血红蛋白测定试剂及 HbA1c 测定试剂; 校准液(批号: 3670506); 美国 BIO-RAD VARIANT II 糖化血红蛋白分析仪配套试剂; 离子交换柱(批号: EA51800); 缓冲液 A(批号: AA70648), 缓冲液 B(批号: AA70497), 清洗液(批号: AA70650); 校准品(批号: BB62636); 全血底物(批号: AA70003)。

1.3 方法

1.3.1 HbA1c 测定 严格按照仪器、试剂说明及相关实验室技

术操作规程进行检测。标准曲线制作根据 AEROSSET 全自动生化分析仪说明书设定相关检测参数, 根据所得浓度与吸光度制作拟合曲线, 并作系列浓度校验。

1.3.2 方法学评价 参照杨昌国等^[4-5]关于美国临床实验室标准化委员会评价方案进行方法学评价。

1.3.2.1 线性评价 用溶血剂稀释 15.4 g/L 标准液, 制成 5 个不同浓度的标本随机排列, 每个标本测定 4 次, 分析在当天完成, 进行线性回归分析。

1.3.2.2 稀释变异试验 取病理组混合全血标本, 加入不同体积的溶血剂, 得到 20 份不同浓度的稀释样品, 检测结果进行统计学分析。

1.3.2.2 精密密度 取健康对照组混合全血标本, 和病理组混合全血标本各 1 份, 两份标本每天测定 2 次(2 次测定间隔大于 2 h), 每次测定做作双份, 共测定 20 d。每次测定做 1 个质控。

1.3.2.3 灵敏度 将健康对照组混合全血标本用溶血剂倍比稀释作为待检标本, 用溶血剂作为空白, 所测吸光度能区别于蒸馏水的最低 HbA1c 浓度为该法的最低灵敏度。

1.3.2.4 干扰试验 在两份健康对照组混合全血标本中分别加入混合高胆红素血清、混合高三酰甘油血清和混合高尿素血清, 另一份中加入等体积的蒸馏水, 按比例混合成 5 个不同干扰物浓度, 每份标本重复测定 4 次, 计算分析干扰。

1.3.2.5 对比试验 健康对照组 40 份标本及 2 型糖尿病患者 57 份全血标本分别在 AEROSSET 全自动生化分析仪和 BIO-RAD VARIANT II 糖化血红蛋白分析仪上检测 HbA1c。

1.3.2.6 标本放置时间对结果的影响^[6] 混合全血标本及溶血后标本在密闭 4℃ 放置 1 d、2 d、4 d、1 周、2 周、1 月和 6 月后分别检测 4 次, 取均值, 分析时间因素对结果的影响。

1.5 统计学处理 对重复性验证结果进行中位数、95% 可信区间分析, 对方法学比较结果进行配对资料 *t* 检验, 采用 SPSS 10.0 for Windows 统计软件包进行辅助分析。

2 结果

2.1 糖化血红蛋白检测标准曲线 见图 1。

2.1.2 HbA1c 浓度检测 采用两点定标方式。