

然而血清中的一些成分如酸性多糖、糖蛋白、血红蛋白、脂类及其代谢产物的存在将会直接影响 FQ-PCR 的测定结果,有研究表明血红蛋白可通过其卟啉环与 Taq 酶的不可逆结合而抑制 Taq 酶活性,从而影响 PCR 测定^[11-12],这将使得在监测患者治疗中 HBV DNA 的定量检测失去临床价值,而且在定性测定时也会由于这些抑制物的存在,而使弱阳性标本的 PCR 测定出现假阴性结果。直接煮沸法由于其只是简单地将核酸释放出来,所得 DNA 产物不纯,为消除检测错误而导致误诊,在核酸提取过程中应加注意。对溶血、脂血标本,以及复杂的生物液态物或是难以分解的细胞如乳汁、精液等仍需按商用试剂盒提取核酸的方法提取。

参考文献:

[1] Moody A, Sellers S, Bumstead N. Measuring infectious bursal disease virus RNA in blood by multiplex real-time quantitative RT-PCR[J]. *Viml Methods*, 2000, 85(12): 55-64.

[2] Hussain Z, Das BC, Husain SA, et al. Biological course of hepatitis A virus as determined by real time RT-PCR: Correlation with biochemical, immunological and genotypic profiles[J]. *World J Gastroenterol*, 2006, 12(29): 4683-4688.

[3] Gal S, Fidler C, Lo YM, et al. Quantitation of circulating DNA in the serum of breast cancer patients by real-time PCR[J]. *Br J Cancer*, 2004, 90: 1211-1215.

[4] Nistor A, Watson PH, Pettigrew N, et al. Real-time PCR complements

immunohistochemistry in the determination of HER-2/neu status in breast cancer[J]. *BMC Clin Pathol*, 2006, 6(1): 2-10.

[5] Wang X, Li X, Currie RW, et al. Application of real-time Polymerase chain reaction to quantitate induced Expression of interleukin-beta mRNA in ischemic brain tolerance[J]. *J Neurosci*, 2000, 59(2): 238-246.

[6] De-Kok JB, Ruers TJ, Van-Muuen GN, et al. Real-time quantification of human telomerase reverse transcriptase mRNA in tumors and healthy tissues[J]. *Clin Chem*, 2000, 46(3): 313-318.

[7] 李成德, 陈享, 梁莉红. 两种 HBV-DNA 定量测定方法的比较[J]. *热带医学杂志*, 2006, 6(1): 36-38.

[8] 杨洁, 关宇, 王燕军, 等. LightCycler 实时监测 PCR 定量分析血清 HBV DNA[J]. *热带医学杂志*, 2002, 2(2): 118-120.

[9] 程钢, 何蕴韶, 周新宇. 荧光定量聚合酶链反应检测乙型肝炎病毒[J]. *中华医学检验杂志*, 1999, 22(3): 135-138.

[10] 李金明. 聚合酶链反应临床应用的优越性和局限性[J]. *中华检验医学杂志*, 2005, 28(3): 225-227.

[11] Neumaier M, Braun A, Wagener C. Fundamentals of quality assessment of molecular amplification methods in clinical diagnostics[J]. *Clin Chem*, 1998, 44: 1-26.

[12] MM3-A. Molecular diagnostic methods for infectious diseases: approved guideline[J]. *NCCLS*, 1995, 15(22): 32-33.

(收稿日期: 2012-01-08)

• 检验技术与方法 •

化学发光法测定梅毒抗体的性能验证

马开富

(湖北省襄阳市中心医院 441021)

摘要:目的 对美国雅培公司化学发光法测定梅毒螺旋体抗体的临界(Cut-off)值、精密度、灵敏度和特异性等进行验证和评价。方法 分别使用美国临床和实验室标准化协会(CLSI)发布的 EP5-A2、EP-17A 对其精密度和灵敏度进行评价,使用梅毒螺旋体明胶凝集试验(TPPA)确认试验对其特异性进行评价。结果 化学发光法的 Cut-off 值以 0.36 最佳,精密度、灵敏度和特异性与厂家数据一致。结论 美国雅培公司化学发光法测定梅毒螺旋体抗体的性能符合要求。

关键词:梅毒; 螺旋体属; 化学发光测定法; 性能验证

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.09.034

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)09-1102-03

因原发性病例快速增加和复发率非常高,梅毒已成为世界各国严重的公共卫生问题^[1]。血清学诊断是梅毒诊断的重要手段^[2-3],正确评估梅毒血清学诊断试验方法,对于指导实际应用具有非常重要的意义。化学发光法(CMIA)是近年来美国雅培等公司推出的全自动梅毒特异性抗体测定方法,特点是简便、准确、经济,以往的性能评价主要集中在敏感性、特异性,以及与其他常用方法结果符合性等方面^[4-6]。本文主要根据 ISO15189 医学实验室质量和能力认可准则临床免疫学检验领域指南的要求,对美国雅培公司 CMIA 测定梅毒螺旋体抗体的临界(Cut-off)值、精密度、灵敏度和特异性进行验证和评价。

1 资料与方法

1.1 仪器与试剂 使用美国雅培 ARCHITECT-i2000 System,试剂为雅培配套试剂 ARCHITECT Syphilis TP。梅毒螺旋体明胶凝集试验(TPPA)试剂采用日本富士瑞必欧株式会社试剂盒(包含溶解液、血清稀释液、致敏粒子和阳性对照血清等)。

1.2 检测对象与方法 验证美国雅培 ARCHITECT-i2000 System 检测系统 Cut-off 值,分别使用美国临床实验室标准化委员会(NCCLS)有关指南文件 EP5-A2(临床化学设备精密性能的评价)和 EP-17A(极限参数指南)对其方法的精密度和灵敏度进行评价。

1.2.1 Cut-off 值验证 血清来源于本院 2009 年 1~12 月住院患者和体检者,包含 6 168 例住院患者、6 237 例体检者梅毒螺旋体抗体为阴性的 OD 值结果。

1.2.2 精密度评价 确认仪器运转良好,试剂在有效期内且定标通过,室内质控在控。每天测定一个批次实验样本,样本为卫生部临床检验中心室内质评血清(-20℃冷冻保存),每批次重复测定 4 次,连续测定 5 d,按以下公式计算重复性评价

(批内)的标准差(s): $s_r = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^n (\bar{x}_{ij} - \bar{x}_i)^2}{I(n-I)}}$ 。其中 I 为总运行天数, n 为每批重复检测次数, \bar{x}_{ij} 为第 i 日第 j 次重复检测结

果, (\bar{x}_i) 为第 i 日所有重复检测结果的均数。 $B = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^I (\bar{x}_i - \bar{x})^2}{I-1}}$ 。其中 I 为总运行天数, \bar{x}_i 为第 i 日所有重复检测结果的均数, \bar{x} 为所有工作日检测结果的均数。室内(总)精密度评价计算公式: $s_r = \sqrt{B^2 + \frac{n-1}{n} s_r^2}$ 。其中 n 为每一批重复次数, B 为日均数, s_r^2 为重复性变异(s 的平方)。

1.2.3 灵敏度评价 确认仪器运转良好, 试剂在效期内且定标通过, 室内质控在控。用空白样品(S_0)和已知浓度(卫生部临床检验中心室间质评血清 1 NCU/mL)的标本(S_H)配置由低至高 6 个水平的样品, 分别为 S_0 、 $4S_0 + S_H$ 、 $3S_0 + 2S_H$ 、 $2S_0 + 3S_H$ 、 $S_0 + 4S_H$ 、 S_H , 其中空白样品进行批内 10 次重复测定, 其他系列样品进行日间重复测定, 共 10 d。求检测低限(LLD): 将空白样品重复 10 次, 进行批内测定, 计算空白(响应量)均值($\bar{x}_{\text{空白}}$)和标准差($s_{\text{空白}}$)。通常估计 95.0% 或 99.7% 两种可能性。95.0% 可能性为: $LLD = \bar{x}_{\text{空白}} + 2s_{\text{空白}}$; 99.7% 可能性为: $LLD = \bar{x}_{\text{空白}} + 3s_{\text{空白}}$ 。如果该方法在测定范围内测定物质与吸光度之间呈线性, 则可求出 LLD 浓度。求生物检测限(BLD): 对多个近于检测限浓度的样品(肯定不是空白样品)进行日间重复检测 20 次(不低于 10 次), 计算扣除空白响应量后样品检测响应量的均值(A)、标准差($s_{\text{检测限样品}}$)和变异系数(CV)。按正态分布规律, 95.0% BLD 可能性为: $BLD = LLD + 2s_{\text{检测限样品}}$; 99.7% BLD 可能性为: $BLD = LLD + 3s_{\text{检测限样品}}$ 。求功能灵敏度(FS): 对多个近于检测限浓度的样品进行日间重复测定, 计算扣除空白响应量后的样品检测响应量的 CV, 从中选择具有或最接近于 20% CV 对应浓度, 即为 $FS^{[7]}$ 。

1.2.4 特异性评价 使用本院过去 12 个月中经 TPPA 确认的 412 份阳性患者标本对其特异性进行评价, 其中如果 TPPA 呈弱阳性(小于一个加号)而且 CMIA 测定结果 $S/CO < 0.3$ 者由另外技术熟练的技术人员同时进行复查, 两次均为阳性者判定为阳性, 两次均为阴性者判定为阴性, 一阴一阳者进行再次复查。

1.3 统计学处理 精密度和灵敏度测定数据类型为计数资料, 以频数和相对数形式表示(%)。用 SPSS11.5 统计软件进行分析, 采用 χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 Cut-off 值验证结果 阴性标本梅毒螺旋体抗体的测定值呈正偏态分布, $\bar{x} = 0.102$, $s = 0.085$, 以 $\bar{x} + 3s$ 为其 Cut-off 值, 则 Cut-off 值为 0.36。

2.2 精密度实验结果 总 \bar{x} 为 0.488 5, 批内 $s = 0.029$ (CV 5.9%), 总 $s = 0.035$ (CV 7.1%), 见表 1。

表 1 精密度实验结果

项目	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天
第 1 次	0.52	0.49	0.45	0.46	0.53
第 2 次	0.49	0.48	0.53	0.49	0.47
第 3 次	0.50	0.54	0.48	0.48	0.49
第 4 次	0.47	0.44	0.49	0.47	0.44
\bar{x}	0.50	0.49	0.49	0.48	0.48

2.3 灵敏度实验结果 LLD 为 0.02 NCU/mL, BLD 接近 0.2 NCU/mL, FS 为 0.4 NCU/mL, 见表 2、3。

2.4 特异性实验结果 选取本院 12 个月以来所有筛查梅毒

标本中经 TPPA 确认实验为阳性的标本 412 例(一个加号以上), 用 CMIA 方法再次测定, 结果全部为阳性, 特异性达 100.00%。

表 2 灵敏度实验结果[发光强度(RLU_s)]

次数	S_0	$4S_0 + S_H$	$3S_0 + 2S_H$	$2S_0 + 3S_H$	$S_0 + 4S_H$	S_H
第 1 次	1 322	2 306	4 613	6 919	9 226	11 532
第 2 次	1 312	2 338	4 376	7 113	9 351	11 689
第 3 次	1 329	2 287	4 573	6 858	9 146	11 433
第 4 次	1 326	2 305	4 511	6 910	9 221	11 527
第 5 次	1 348	2 561	4 522	6 738	9 044	11 305
第 6 次	1 322	2 224	4 448	6 678	8 895	11 119
第 7 次	1 376	2 337	4 675	7 010	9 349	11 687
第 8 次	1 311	2 477	4 554	6 832	9 108	11 386
第 9 次	1 321	2 292	4 583	6 871	9 166	11 458
第 10 次	1 317	2 306	4 411	6 819	9 222	11 528

表 3 分析灵敏度计算结果(NCU/mL)

项目	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
\bar{x}	1 065	3 248	5 596	7 894	10 188
s	99.8	93.1	125.1	1 371.0	171.4
CV(%)	43.2	21.1	18.3	14.9	14.9

3 讨 论

人体感染梅毒螺旋体后可产生两类抗体: 一类是特异性的抗梅毒螺旋体抗体(IgG、IgM), IgG 抗体可终身存在, 但浓度一般较低, 不能预防再感染, IgM 抗体持续时间短; 另一类是由螺旋体破坏组织细胞释放的类脂样物质及螺旋体自身的类脂和脂蛋白刺激机体产生的非特异性抗体(IgG、IgM)^[8]。梅毒的血清学诊断也因此分为特异性、非特异性梅毒螺旋体抗体检测两大类。

目前本院大批量输血前梅毒筛查使用美国雅培公司 ARCHITECT-i2000 System, 所用试剂为雅培配套试剂 ARCHITECT Syphilis TP, 检测原理为标本与包被有重组抗原(TpN15、TpN17 和 TpN47)的磁微粒及稀释液混合后, 标本中的抗体与磁微粒上的抗原结合, 清洗后加入标记 acridinium 的抗人 IgG 或 IgM, 孵育并洗涤后加入预激发液和激发液, 通过测定反应液的相对 RLU_s 反映抗体水平。

CMIA 法判读结果的难点是标准(即 Cut-off 值)的设定, 虽然各厂家生产的 CMIA 试剂盒均提供 Cut-off 值的计算方法, 但不同批次试剂盒使用相同 Cut-off 值, 且多年使用同一 Cut-off 值的现象普遍存在, 显然存在不合理性。由于试剂盒生产工艺的不均一性, 不同厂家、不同批次试剂盒的反应效果不尽相同^[9], 所用 Cut-off 值应当不同(同批次试剂用阴、阳性对照, 质控血清等进行日常验证)。所以按照 ISO15189 对检验程序的要求, 作者计算出适合本室的 Cut-off 值, 以确保合适的灵敏度和特异性。试剂盒设定的梅毒螺旋体抗体的 Cut-off 值为 0.99, 即大于 0.99 判断为阳性, 本研究计算得到的 Cut-off 值为 0.36。

精密度是指常规条件下所获得独立测量结果的接近程度。

目前国内最普及的精密评价方案是对稳定的样本进行多次测量,求这些重复测量值的 \bar{x} 和 s 以及 CV。而 EP5-A2 是目前精密评价实验方案中最全面和最具统计学效能的。其适用于实验室对所有仪器或自建检测系统的精密性能进行验证或评价,所以本研究选择该方法对 CMIA 测定梅毒螺旋体抗体进行精密评价,结果显示总精密性小于厂家声称的数值(阳性质控总精密性小于或等于 15%)。

本研究采用美国临床和实验室标准化协会(CLSI)的 EP-17A 文件对 CMIA 测定梅毒螺旋体抗体的灵敏度(包括 LLD、BLD 和 FS)进行了评价。结果显示 LLD 为 0.02 NCU/mL, BLD 接近 0.2 NCU/mL, FS 为 0.4 NCU/mL, 厂家声称灵敏度大于或等于 99.00%。本研究结果显示,特异性为 100.00%, 厂家声称特异性为 99.76%。

本研究根据中国合格评定国家认可委员会(CNAS)中对方法学的要求,选定目前国内外常用的 CLSL 系列标准文件^[10]对 CMIA 检测梅毒螺旋体抗体的性能进行了验证,结果与厂家声称数据一致,达到了对其方法学验证的目的,证明了 CMIA 测定梅毒螺旋体抗体的性能符合要求。

参考文献:

[1] 李安信,王鹰. 梅毒的诊断和治疗策略[J]. 传染病信息, 2007, 20(1):26-29.

[2] 卢毅. 梅毒血清学检测方法应用近况[J]. 医学动物防制, 2009, 25(3):184-186.

[3] 肖春梅,朴桂花,李富荣,等. 梅毒血清学实验室检查及临床应用[J]. 实用医学杂志, 2011, 27(8):1485-1486.

[4] 赵娟,谭延国. 化学发光法检测梅毒抗体的实验评价[J]. 中国皮肤性病杂志, 2008, 22(10):626-627.

[5] Knight CS, Mary A, Crum. Evaluation of the LIAISON chemiluminescence immunoassay for diagnosis of syphilis[J]. Clin and Vaccine immunology, 2007, 14(6):710-713.

[6] Mo XH, Jin YL, Yang Y, et al. Evaluation of a new chemiluminescence immunoassay for diagnosis of Syphilis[J]. European journal of medical research, 2010, 15(1):66-69

[7] 杨有业,张秀明. 临床检验方法学评价[M]. 北京:人民卫生出版社, 2009:98-162.

[8] 陶小华. 梅毒的临床免疫学研究进展[J]. 岭南皮肤性病科杂志, 2009, 16(1):65-66.

[9] 曹文岑,宋卫忠,毕超,等. 六种梅毒初筛试剂的评价[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(2):129-130.

[10] 杨志钊,缪丽韶,杨山虹,等. 利用 CLSL EP15-A 指南验证精密性和准确度[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(3):231-232.

(收稿日期:2012-01-08)

• 检验技术与方法 •

普通促凝管与 EDTA-K₂ 抗凝管在血糖测定中差异的探讨

石秀芳, 教家富, 雷 婷, 刘莹莹
(安徽省亳州市人民医院 236800)

摘要:目的 探寻一种快速、准确的血糖检测方法,并且适用于乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K₂)抗凝血浆。方法 将同一份标本分别抽取于不含抗凝剂的促凝管中和含 EDTA-K₂ 的抗凝管中,分别对血清、血浆用 HITACHI7600 全自动生化分析仪检测血糖,观察抗凝剂 EDTA-K₂ 的使用对检测结果的影响。结果 EDTA-K₂ 抗凝组血糖检测结果与血清对照组比较,差异无统计学意义($P=0.2697$)。结论 EDTA-K₂ 抗凝剂抗凝血浆较适用于葡萄糖含量的测定,不仅在急诊检验中可大大缩短报告时间,而且在糖尿病的普查、监控和疗效观察中,特别是在婴幼儿手足口病筛查中均有重要意义。

关键词:依地酸; 血糖; 设备和供应; EDTA-K₂ 抗凝; 全自动生化分析仪

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.09.035

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)09-1104-02

伴随医院信息系统和全自动生化分析仪的普及,传统工作模式发生了改变,由以前多管标本分别测定不同项目转变为单管标本进行多项目测试的分析方式,且逐步采用原始管上机,使部分实验室,尤其是标本量大的实验室血标本在采集后常常不能及时上机;为能更好的分离血清,离心前还常常放置 37℃ 恒温水浴箱中 15 min 以上等,这些举措无形中促进了血糖的体外降解速度,同时对其他生化检测项目也带来一定影响,从而降低了实验的准确性^[1]。因而,需探寻一种既能延缓体外血糖降解,同时又方便实验室急诊工作需要的抗凝剂。在急诊检验中常需要快速取得结果,但在不用抗凝剂的情况下短时间内很难分离出血清,耽误了报告结果的时间。为探讨何种抗凝剂适用于血糖的测定,作者进行了如下探讨。

1 资料与方法

1.1 仪器与试剂 仪器为 HITACHI7600 全自动生化分析仪。血糖试剂由日本第一化学公司提供,批号:820RDI(血糖),按说明书操作。

1.2 标本来源 随机抽取本院体检、门诊、住院患者 105 例。

1.3 方法 采静脉血 4 mL,血清对照管和抗凝管各加 2 mL,混匀,血清对照管及时分离于上午 10:30 测定,抗凝管于血常规检测完成后下午 16:00 测定。

1.4 统计学处理 采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K₂)抗凝组血糖检测结果与血清对照组比较,差异无统计学意义($t=1.1097, P=0.2697$),见表 1。

表 1 血清与 EDTA-K₂ 抗凝血浆检测结果比较 (mmol/L)

组别	\bar{x}	s	P
血清对照组	5.411 4	1.236 9	—
EDTA-K ₂ 抗凝组	5.229 6	1.135 2	0.269 7

—:表示无此项。

3 讨论

2010 年官方报道全国手足口病发病达 177 万,亳州是皖