

• 经验交流 •

微孔板清洗程序在血型检测中的应用

甄志军
(河北省邢台市中心血站 054000)

摘 要:**目的** 建立标准化的微板清洗程序,保证血型检测的质量。**方法** 通过使用 3 种常见的清洗液对含血细胞的微板以及只含血浆的微板进行清洗,并对清洗的效果进行统计学评价,选择最佳条件。**结果** EIA 洗液对含血细胞的微板清洗效果较好,对微板残留抗-A、抗-B 物质的清洗效果最好。**结论** 3 种洗液中,EIA 洗液的综合清洗效果最好,清洗 4 遍,可以保证血型板的检测效果。

关键词:红细胞血型; 正定型; 反定型; 微孔板

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.04.052 **文献标识码:**B **文章编号:**1673-4130(2012)04-0486-02

红细胞血型的检定对安全输血非常重要,到目前为止,在血站系统内,对无偿献血者血型的大规模筛查,多使用全自动加样仪配合微孔板的方法进行判读^[1],此方法不但操作简便,结果准确,而且节省试剂血清,并且也可以实现检测结果的长期保存。因此,在此方法自 1996 年面世以来^[2],就迅速在血站系统中得到了快速普及^[3]。然而,由于这种试验方法的敏感性很高,非常容易受到外来因素的干扰,而得出错误的结果^[4-5]。在本站的工作实践中,笔者发现:微孔板清洗不彻底,是导致错误结果的一个重要原因。为避免此原因导致的错误结果,笔者在本单位建立了微孔板的标准化清洗程序,保证了检测质量,现报道如下。

1 材料与试剂

- 1.1 标本** 本站献血者 EDTA-Na₂ 抗凝新鲜标本 6 638 例。
- 1.2 试剂** 河北医科大学抗-A、抗-B 标准血清;北京金豪 4% ABO 红细胞。
- 1.3 仪器** 自动加样系统(RSP150,瑞士 TECAN)和 Thermo 温育振荡器;Thermo 洗板机;平板离心机;U 型微孔板,SUNRISE 酶标仪。
- 1.4 方法步骤** 微孔板血型标准操作方法:参考赵君等的方法^[6],使用 RSP 控制软件 Logic,取生理盐水 300 μL 加入预稀释板,在反定型板奇偶列上分别加入 50 μL 标本血清,再在奇数列加入 4% A 细胞、偶数列加入 4% B 细胞各 40 μL,在正定型板奇偶列上分别加入抗-A、抗-B,再分别加入稀释后标本红细胞各 30 μL;所有微板 25 ℃ 温育振荡 6 min,频率为 500/min,平板离心机离心 1 000 r/min,2 min,振荡 30 s,频率为 800/min,静置 3 min 后,在波长 620 nm 下,判读反应结果。

取 6 块微孔板,分成 3 组,每组 2 块,随机选择 48 例 A 型、B 型标本,在一块板上,按照正定型方式进行加样,另一块板上用反定型方式进行加样,并按照上述方法完成试验后,静置微板 3 h。然后,3 组微板分别用 1N 的 Hcl、1N 的 NaOH 和普通的 EIA 洗液进行清洗。对正反定型的微孔板的 1、2 列吸液,3、4 列洗一遍,5、6 列洗 2 遍,直至 11、12 列洗 5 遍。清洗完毕后,对微板清洗效果进行评价;另取 6 块微孔板,分成 3 组,每组 2 块,随机选择 48 例 O 型标本,每份标本加奇偶两列,每孔加 100 μL 血清;微板静置 3 h。对正反定型的微孔板的 1、2 列吸液,3、4 列洗一遍,5、6 列洗 2 遍,直至 11、12 列洗 5 遍。清洗完毕后,按照正常程序在 3 组微板板上做随机选择的 48 例 A 型、B 型血的正反定型检测。

2 结 果

取出微板,3 组微板分别用 1N 的 Hcl、1N 的 NaOH 和普

通的 EIA 洗液进行清洗。清洗完毕后,根据板底细胞残留情况进行评价,统计情况见表 1。

表 1 不同洗液洗板情况(分)						
洗液	只吸液	洗 1 遍	洗 2 遍	洗 3 遍	洗 4 遍	洗 5 遍
1N 的 Hcl	16(0)	14(2)	10(6)	8(8)	6(10)	5(11)
1N 的 NaOH	16(0)	8(8)	1(15)	0(16)	0(16)	0(16)
EIA 洗液	16(0)	8(8)	1(15)	0(16)	0(16)	0(16)

利用 SPSS 13.0 软件对上述结果进行卡方检验,洗液的 $F=19.527, P=0.000<0.01$,差异有统计学意义;洗板次数的 $F=30.26, P=0.000<0.01$,差异有统计学意义。碱洗微板与 EIA 洗液清洗的微板之间的 $P=1>0.05$,差异无统计学意义;碱洗微板、EIA 洗液清洗的微板与酸洗微板之间的 P 值为 $0.001<0.01$,差异有统计学意义。

第二组中,使用酸洗微板进行加样操作,在静置不同时间后进行判读,判读结果错误数见表 2;第二组中,使用碱洗微板进行加样操作,在静置不同时间后进行判读,判读结果错误数见表 3;第二组中,使用 EIA 洗液洗微板进行加样操作,在静置不同时间后进行判读,判读结果错误情况见表 4。

表 2 酸洗微板再次检测错误情况						
时间	只吸液	洗 1 遍	洗 2 遍	洗 3 遍	洗 4 遍	洗 5 遍
60 s	8	3	2	0	0	0
120 s	8	4	3	0	0	0
180 s	8(0 分)	4(4 分)	3(5 分)	1(7 分)	0(8 分)	0(8 分)

表 3 碱洗微板再次检测错误情况						
时间	只吸液	洗 1 遍	洗 2 遍	洗 3 遍	洗 4 遍	洗 5 遍
60 s	8	6	2	2	2	2
120 s	8	8	3	3	3	3
180 s	8(0 分)	8(0 分)	3(5 分)	4(4 分)	3(5 分)	3(5 分)

按照判读程序,取静置 3 min 后的判读结果,用 SPSS V13.0 软件进行卡方检验,洗液的 $F=11.97, P=0.002<0.01$,差异有统计学意义;洗板次数的 $F=21.303, P=0.002<0.01$,差异有统计学意义。酸洗微板与 EIA 清洗的微板之间的 $P=0.297>0.05$,差异无学意义;酸洗微板、EIA 清洗的微板与碱洗微板之间的 P 值分别为 $0.005, 0.001<0.01$,差异有

统计学意义。

综合以上实验结果,可以看出,以 EIA 洗液的清洗效果为最好,并且对于再次检测的影响最小。因此,最后确定洗板的最佳方法为:使用 EIA 洗液,清洗 4 遍。

使用此方法对实验用 U 型微孔板进行清洗,并用清洗后的微板对近 2 个月的 6 638 例标本进行血型检测,无错误结果出现。

表 4 EIA 洗液清洗微板再次检测错误情况						
时间	只吸液	洗 1 遍	洗 2 遍	洗 3 遍	洗 4 遍	洗 5 遍
60 s	8	2	0	0	0	0
120 s	8	3	0	0	0	0
180 s	8(0 分)	3(5 分)	1(7 分)	0(8 分)	0(8 分)	0(8 分)

3 讨 论

U 型微孔板检测血型,是目前血站系统进行大规模血型检测的最常用方法,微孔板的质量对结果的判定具有重要的影响^[7]。现阶段,为了减低检测成本,除部分血站外。多数血站的 U 型微孔板均为重复使用^[8]。这种血型用微孔板多为聚苯乙烯材料制成,此材料制做的微孔板对抗原、抗体物质具有良好的吸附作用^[9]。如不能对使用过的微孔板进行良好的清洗,在孔中残留的抗-A、抗-B 物质就会与加入的血细胞产生凝集反应,从而干扰血型的判定,导致出现错误结果。但是,到目前为止,笔者尚未见到关于 U 型微孔板清洗的相关文献报道。就笔者的了解,目前血站检验科对于 U 型微孔板清洗的随意性较大,很难保证清洗的效果,并且也不符合二级生物安全实验室的要求,对实验室工作人员的安全也是一种威胁。

基于以上原因,笔者考虑通过对不同洗液,不同洗板时间、次数的试验摸索,建立起一套标准化的微孔板清洗程序,实现微板清洗的规范化、标准化。

酸碱洗液均为常用的清洗液体,对于实验器皿的清洗效果较好,但是这两种洗液由于都具有较强的腐蚀作用,在用于血型板的清洗时效果并不理想。

在对含细胞微板进行清洗时,1N Hcl 洗液使血细胞发生变性作用,使得细胞扣紧贴在微孔板底部,清洗效果很差。而其余洗液在对含细胞微板的清洗效果较好。

• 经验交流 •

在对吸附微板进行清洗后,再次进行试验时,HCl 洗液和 NaOH 洗液的残留液很容易使血细胞发生变性作用,导致结果出现错误。尤其是 NaOH 溶液,如果在用 NaOH 清洗后,不用蒸馏水反复再清洗多次,其残留液很容易导致细胞溶血,从而引起错误判读。

相对上两种清洗液,EIA 洗液由于其既含有疏水基团,又含有亲水基团,并且无腐蚀作用,清洗效果极好;并且,在用此微板再次进行试验时,也不会对试验结果产生不利影响。

从以上结果可以看出,3 种清洗液以 EIA 洗液对血型的影响为最小,并且,清洗 3 遍以上,基本可以杜绝抗 A、抗 B 物质的残留。本站设定用 EIA 洗液清洗 4 遍,建立此清洗程序后,连续对近 2 个月共 6 638 例标本进行检测,取得了良好的检测结果。

参考文献

[1] 夏卫,郭永芳,姚锦炎,等. ABO 血型全自动微板检测法可靠性探讨[J]. 中国输血杂志,2000,14(2):166-167.

[2] Knight RC, De Silva M. New technologies for red-cellserology. Blood Reviews,1996,10(1):101

[3] 葛红卫,王鸿捷,韩卫,等. ABO 血型自动化检测方法的建立[J]. 中国输血杂志,1998,11(1):63.

[4] 胡继征,连贯文,卢岑,等. 献血者 ABO 血型正反定型不一致血清学原因分析[J]. 国际检验医学杂志,2009,30(4):388-389.

[5] 张慧莲,杨婷,于洋. ABO 血型正反定型不一致原因分析[J]. 国际检验医学杂志,2011,32(9):1005-1006.

[6] 赵君,邢培清,刘玉振,等. 大批量微板自动化检测正反定 ABO 及 RhD 血型的研究[J]. 河南医学研究,2007,4(3):205-211.

[7] 夏卫,郭永芳. 全自动加样扫描分析系统测定 ABO 血型[J]. 临床检验杂志,1999,17(2):238.

[8] 季建兵,姜标. RH(D)血型初筛的自动化检测[J]. 临床输血与检验,2005,7(2):130.

[9] 胡继征,陆典瑞,李启辉,等. 全自动微板法筛查献血者 RH 血型 D 抗原的检测方法[J]. 河南科技大学学报(医学版),2005,23(2):250.

(收稿日期:2011-07-09)

送检时间对血清 HCV-RNA 定量检测结果的影响

梁耀荣,吴小燕

(贵州省遵义医学院第五附属医院检验科,珠海 519100)

摘 要:目的 探讨不同送检时间对血清 HCV-RNA 荧光定量检测结果的影响。方法 收集 HCV 强阳性标本 12 例和弱阳性血清 16 例,分别在室温下 0、6、12、18 和 24 h 后进行 PCR 定量检测 HCV-RNA 含量,将 0 h 作为对照组。每份标本重复检测 2 次。数据结果利用 SPSS13.0 软件进行统计分析。**结果** 强阳性组和弱阳性组 HCV-RNA 的拷贝数在室温放置 6、12、18 和 24 h 的结果与对照组比较差异均无统计学意义($F=0.898,P=0.466;F=0.359,t=0.837$)。**结论** 送检时间在 24 h 内对 HCV-RNA 的荧光定量 PCR 检测结果无显著的影响,各实验室间的差异应考虑实验者的操作熟练度。

关键词:肝炎,丙型; RNA,病毒; 聚合酶链反应
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.04.053

文献标识码:B **文章编号:**1673-4130(2012)04-0487-03

HCV 是一条有包膜的 B 族虫媒病毒家族的单股正链 RNA 病毒^[1],许多研究证明丙型肝炎易慢性化,这有可能加快肝硬化,最终导致肝细胞肝癌^[1-3]。HCV-RNA 是 HCV 的核

心成分,HCV-RNA 荧光定量检测被认为是诊断 HCV 病毒血症的“金标准”^[4-5],但由于操作较复杂,对于丙肝患者的血清标本往往不能做到立即检测。为了探讨送检时间对 HCV-RNA