

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

定量检测的影响程度,本试验利用荧光定量 PCR 法对 HCV 强阳性组和弱阳性组标本在室温的一定时间间隔之下进行检测。

1. 资料与方法

1.1 一般资料 根据以往病史收集 2011 年 2~5 月 HCV-RNA 检测强阳性和弱阳性病例血液标本共 28 例,其中强阳性组 12 例,男 8 例,女 4 例;弱阳性组 16 例,男 11 例,女 5 例,各感染病史至少 1 年以上,临床诊断符合《病毒性肝炎防治方案》。

1.2 试剂与仪器 1%DEPC 水,所有试验用枪头,EP 管均用 DEPC 水对外源性 RNA 酶进行处理。HCV-RNA 荧光定量检测试剂盒为达安高科,批号为 2011001;美国 MJ Opticon-2TM 荧光定量 PCR 仪。

1.3 方法

1.3.1 标本采集 用真空抽血管抽取患者静脉血 5 mL,标本离心后分别置室温 0、6、12、18 和 24 h 后检测。

1.3.2 实验操作 严格按照达安丙肝 RNA 荧光定量检测试剂盒操作说明书进行,并同时做 4 例标准品用于绘制标准曲线。

1.3.3 统计学处理 利用 SPSS13.0 对数据进行处理与分析,计量资料以($\bar{x}\pm s$)表示, t 检验检测组间差异。

2 结果

2.1 标准曲线的绘制 四份标准品绘制的标准曲线,计算公式为 $Y=-3.429X+45.787$, X 为拷贝数, Y 为 C_t 值。其中 $r=1.000$,操作误差小,标准曲线能用于 HCV 阳性标本拷贝数的计算。

2.2 强阳性组 HCV-RNA 定量检测结果 各标本利用 PCR 法定量检测血清中 HCV-RNA,结果如表 1, t 检验结果显示组间差异无统计学意义($F=0.898,P=0.466$)。

2.3 弱阳性组 HCV-RNA 定量检测结果 各标本利用 PCR 法定量检测血清中 HCV-RNA,结果如表 2, t 检验结果显示组间差异无统计学意义($F=0.359,t=0.837$)。

表 1 强阳性组 HCV-RNA 定量检测结果 (copy/mL)

标本	对照组	实验组			
	0 h	6 h	12 h	18 h	24 h
1	$(4.17\pm1.23)\times10^5$	$(5.19\pm1.70)\times10^5$	$(5.36\pm2.76)\times10^5$	$(5.89\pm3.51)\times10^5$	$(5.19\pm2.19)\times10^5$
2	$(2.59\pm2.75)\times10^5$	$(2.33\pm2.06)\times10^5$	$(2.32\pm2.96)\times10^5$	$(2.33\pm2.66)\times10^5$	$(2.52\pm2.16)\times10^5$
3	$(2.61\pm1.21)\times10^5$	$(1.17\pm0.83)\times10^5$	$(1.90\pm0.91)\times10^5$	$(1.49\pm0.99)\times10^5$	$(1.39\pm0.74)\times10^5$
4	$(5.24\pm2.97)\times10^5$	$(5.28\pm2.81)\times10^5$	$(5.30\pm1.16)\times10^5$	$(5.46\pm1.27)\times10^5$	$(4.87\pm1.48)\times10^5$
5	$(8.40\pm4.62)\times10^5$	$(5.74\pm4.45)\times10^5$	$(7.90\pm3.08)\times10^5$	$(9.97\pm2.82)\times10^5$	$(10.39\pm4.67)\times10^5$
6	$(2.24\pm1.97)\times10^5$	$(3.48\pm1.21)\times10^5$	$(2.30\pm1.46)\times10^5$	$(4.46\pm1.72)\times10^5$	$(4.87\pm1.38)\times10^5$
7	$(4.13\pm1.20)\times10^5$	$(5.04\pm1.84)\times10^5$	$(3.96\pm2.83)\times10^5$	$(3.16\pm1.16)\times10^5$	$(3.96\pm1.77)\times10^5$
8	$(7.46\pm3.01)\times10^5$	$(7.17\pm1.78)\times10^5$	$(6.92\pm0.70)\times10^5$	$(7.03\pm1.09)\times10^5$	$(7.79\pm1.82)\times10^5$
9	$(3.63\pm2.06)\times10^5$	$(5.23\pm0.93)\times10^5$	$(4.86\pm1.90)\times10^5$	$(4.63\pm1.29)\times10^5$	$(4.86\pm1.80)\times10^5$
10	$(5.17\pm3.34)\times10^5$	$(5.49\pm3.40)\times10^5$	$(6.19\pm1.27)\times10^5$	$(5.86\pm3.45)\times10^5$	$(6.29\pm2.06)\times10^5$
11	$(1.99\pm0.75)\times10^5$	$(2.33\pm1.06)\times10^5$	$(2.32\pm1.46)\times10^5$	$(2.33\pm1.36)\times10^5$	$(2.52\pm0.96)\times10^5$
12	$(7.01\pm1.91)\times10^5$	$(7.07\pm0.73)\times10^4$	$(7.30\pm0.61)\times10^5$	$(7.40\pm0.69)\times10^5$	$(7.59\pm0.84)\times10^5$
$\bar{x}\pm s$	$(5.87\pm2.23)\times10^5$	$(6.29\pm1.70)\times10^5$	$(6.16\pm1.76)\times10^5$	$(5.89\pm2.51)\times10^5$	$(6.29\pm2.19)\times10^5$

表 2 弱阳性组 HCV±RNA 定量检测结果 (copy/mL)

标本	对照组	实验组			
	0 h	6 h	12 h	18 h	24 h
1	$(5.88\pm3.43)\times10^3$	$(7.16\pm2.38)\times10^3$	$(4.47\pm2.23)\times10^3$	$(6.16\pm3.38)\times10^3$	$(6.44\pm3.36)\times10^3$
2	$(4.87\pm2.23)\times10^3$	$(5.89\pm1.70)\times10^3$	$(5.56\pm1.76)\times10^3$	$(4.89\pm2.51)\times10^3$	$(4.89\pm2.19)\times10^3$
3	$(8.19\pm0.94)\times10^3$	$(5.81\pm3.88)\times10^3$	$(6.85\pm3.51)\times10^3$	$(8.62\pm1.64)\times10^3$	$(5.83\pm3.19)\times10^3$
4	$(4.24\pm0.97)\times10^3$	$(3.48\pm0.81)\times10^3$	$(2.30\pm1.16)\times10^3$	$(4.46\pm1.27)\times10^3$	$(4.87\pm1.88)\times10^3$
5	$(7.40\pm4.62)\times10^3$	$(3.74\pm4.45)\times10^3$	$(7.90\pm1.08)\times10^3$	$(9.97\pm0.82)\times10^3$	$(10.39\pm1.67)\times10^3$
6	$(4.36\pm2.16)\times10^3$	$(5.23\pm1.93)\times10^3$	$(4.36\pm1.90)\times10^3$	$(4.36\pm1.99)\times10^3$	$(4.36\pm1.89)\times10^3$
7	$(5.77\pm3.34)\times10^3$	$(5.45\pm3.40)\times10^3$	$(6.49\pm1.27)\times10^3$	$(5.26\pm3.45)\times10^3$	$(5.22\pm3.46)\times10^3$
8	$(3.14\pm1.06)\times10^3$	$(4.85\pm1.72)\times10^3$	$(2.81\pm1.29)\times10^3$	$(5.75\pm3.54)\times10^3$	$(2.81\pm1.62)\times10^3$
9	$(4.91\pm0.90)\times10^3$	$(5.14\pm1.20)\times10^3$	$(5.89\pm1.87)\times10^3$	$(4.83\pm0.72)\times10^3$	$(4.88\pm0.95)\times10^3$
10	$(2.99\pm0.75)\times10^3$	$(2.33\pm1.06)\times10^3$	$(2.32\pm1.16)\times10^3$	$(2.33\pm1.66)\times10^3$	$(2.52\pm0.96)\times10^3$
11	$(2.01\pm1.91)\times10^3$	$(1.07\pm0.73)\times10^4$	$(1.40\pm0.61)\times10^3$	$(1.40\pm0.69)\times10^3$	$(1.59\pm0.84)\times10^3$
12	$(8.33\pm0.76)\times10^3$	$(7.23\pm1.02)\times10^3$	$(5.90\pm1.98)\times10^3$	$(7.25\pm0.79)\times10^3$	$(6.78\pm1.19)\times10^3$
13	$(4.63\pm1.40)\times10^3$	$(5.34\pm0.84)\times10^3$	$(3.96\pm1.83)\times10^3$	$(3.96\pm1.76)\times10^3$	$(3.96\pm1.72)\times10^3$
14	$(6.46\pm1.01)\times10^3$	$(7.57\pm1.78)\times10^3$	$(6.92\pm0.70)\times10^3$	$(7.13\pm1.09)\times10^3$	$(7.79\pm0.82)\times10^3$
15	$(4.42\pm2.13)\times10^3$	$(5.14\pm1.64)\times10^3$	$(3.04\pm1.68)\times10^3$	$(3.05\pm1.64)\times10^3$	$(3.38\pm1.16)\times10^3$
16	$(9.53\pm0.87)\times10^3$	$(8.26\pm1.21)\times10^3$	$(6.15\pm4.47)\times10^3$	$(9.11\pm1.15)\times10^3$	$(9.43\pm0.91)\times10^3$
$\bar{x}\pm s$	$(5.45\pm2.61)\times10^3$	$(5.78\pm2.67)\times10^3$	$(4.77\pm2.64)\times10^3$	$(5.52\pm2.87)\times10^3$	$(5.32\pm2.15)\times10^3$

3 讨 论

HCV-RNA 是 HCV 的核心成分,系单股正链的 RNA 病毒,由于基因易变,在不同国家和地区已发现不少于 5 种 HCV 基因型^[6-7]。因此该试剂盒引物选用 HCV 5' 末端变异较少的非编码区。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],直接反映病毒的复制程度,不受窗口期的影响。但 HCV-RNA 的核酸扩增方法灵敏度和特异性差别很大^[8],在不同实验室之间结果很难进行比较。结果的差异与样品的保存、操作者的技术和移液枪的精确度有关。本实验在同一操作者同一实验室的情况下对 HCV-RNA 进行荧光定量检测,来验证室温的送检时间对检测结果的影响。在本实验中强阳性组和弱阳性组的数据比较差异均无统计学意义($F=0.898, P=0.466; F=0.359, t=0.837$),因此,在 HCV-RNA 荧光定量检测结果的差异性与标本的送检时间无关。此观点与徐皖苏等^[2]的观点一致。

HCV-RNA 的遗传物质虽为 RNA,从本实验结果可以推测:实验在未对病毒进行裂解的情况下,内源性 RNA 酶并没有对 HCV 的遗传物质进行消化。而各实验室间的 HCV-RNA 检测结果的差异可能与实验者的操作熟练度有关,在病毒进行裂解 RNA 遗传物质暴露后的过程对实验结果尤为关键。

综上所述,室温保存 24 h 以内对 HCV-RNA 的荧光定量检测结果并没有显著的影响,同时在进行定量检测 RNA 这类遗传物质时,实验室需对操作人员的进行培训上岗。

• 经验交流 •

参考文献

[1] 张秀华. HCV-RNA 在外周血单个核细胞中的复制与丙肝慢性化及复发的关系[J]. 临床肝胆病杂志, 2006, 22(1): 35-36.

[2] 徐皖苏, 杨公炜, 王丽, 等. 不同保存条件下血清荧光定量检测 HCV-RNA 的研究[J]. 预防医学文献信息, 2004, 10(1): 60-62.

[3] 陈勇, 周华蓉. 不同保存条件对血清荧光定量 HCV-RNA 检测的影响[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2009, 1(2): 245-247.

[4] 陈作芬, 曹永平. 丙肝患者治疗前后 HCV-RNA 与抗 HCV 及丙氨酸氨基转移酶水平的分析[J]. 临床医学与检验, 2010, 7(12): 1175-1177.

[5] 钟海军, 唐孝亮, 曾刚毅, 等. 核酸纯化柱提取核酸定量检测丙型肝炎病毒 RNA 的临床应用[J]. 检验医学与临床, 2008, 5(16): 783-798.

[6] 陈应玉, 李京培, 王明丽. 逆转录聚合酶链反应检测 HCV-RNA 血标本保存条件分析[J]. 安徽医科大学学报, 2000, 35(3): 202-204.

[7] Pyne M T, Konnick EQ, Phansalkar A. Evaluation of the Abbott investigational use only real-time hepatitis C virus (HCV) assay and comparison to the Roche TaqMan HCV analyte-specific reagent assay[J]. Clin Microbiol, 2009, 47(19): 2872-2878.

[8] 王露楠, 吴健民, 李金明. 丙型肝炎病毒核酸检测的国家标准物质的研制[J]. 中华检验医学杂志, 2006, 29(4): 354-357.

(收稿日期: 2011-09-11)

肝硬化患者血清细胞间黏附分子-1 和肿瘤坏死因子- α 检测的临床意义

武寿荣

(江苏省滨海县人民医院 224500)

摘 要:目的 探讨细胞间黏附分子-1 (sICAM-1) 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 在肝硬化发病过程中的作用。方法 对于 75 例肝硬化患者, 采用 ELISA 法测定其血清 sICAM-1 和 TNF- α 水平。结果 肝硬化患者血清 sICAM-1 和 TNF- α 水平分别为 $(943.4 \pm 99.8) \text{ ng/mL}$ 和 $(53.4 \pm 12.8) \text{ ng/L}$, 均明显高于对照组 [分别为 $(224.1 \pm 32.7) \text{ ng/mL}$ 和 $(6.7 \pm 2.3) \text{ ng/L}$] ($P < 0.01$), 都随着肝功能分级增加而升高。血清 sICAM-1 水平与 TNF- α 呈显著正相关 ($r = 0.893 2, P < 0.01$), 与 ALB 呈显著负相关 ($r = -0.910 8, P < 0.01$), 与 ALT 呈显著正相关 ($r = 0.856 6, P < 0.01$)。结论 sICAM-1 和 TNF- α 在肝硬化的发生、发展过程中发挥重要作用, 其升高程度与肝硬化严重程度密切相关。

关键词:肝硬化; 可溶性细胞间黏附分子-1; 肿瘤坏死因子- α

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.04.054

文献标识码: B

文章编号: 1673-4130(2012)04-0489-02

细胞间黏附分子-1 (soluble intercellular adhesion molecule-1, sICAM-1) 属于免疫球蛋白超家族成员, 广泛分布在广泛分布在血管内皮细胞、中性粒细胞、巨噬细胞上, 在正常情况下很少表达或不表达^[1], 炎症因素刺激后与其配体作用调节着细胞间黏附, 可以促进中性粒细胞、单核细胞及 T 淋巴细胞浸入到肝脏实质, 参与了炎症反应等许多重要的生理和病理反应; 肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 是一种典型的炎症介质, 亦是肝细胞损伤因子之一, 在各种慢性肝病中均有不同程度的表达^[2], 主要是由单核巨噬细胞分泌, 与机体的免疫反应和介症反应密切相关^[3]。作者研究乙型肝炎后肝硬化患者血清 sICAM-1 和 TNF- α 水平的变化, 探讨其在肝硬化发病中的作用和临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 75 例乙型肝炎后肝硬化患者选自 2007 年 5

月至 2010 年 9 月期间来本院就诊经确诊的肝硬化患者, 全部病例均经临床明确诊断, 并按肝功能 Child-Pugh 分级法分为 A、B、C 级 3 组, 其中 A 级 22 例, B 级 23 例, C 级 30 例。32 例体检健康者列为健康对照组。所有研究对象均排除各种感染、结缔组织病、肿瘤等疾病, 并且近 1 月内未服用抗炎药物。

1.2 试剂与仪器 sICAM-1 试剂盒购自美国 R&D System, 其灵敏度为 0.35 ng/mL 。酶标仪为美国 Bio Rad 产品。TNF- α 试剂盒由北京晶美生物工程公司提供。ALB 和 ALT 试剂盒均为申能产品, 采用 OLYMPUS AU5431 全自动生化分析仪。

1.3 标本采集 所有肝硬化患者自本院住院后次日清晨抽取空腹静脉血, 对照者抽空腹静脉血 1 次, $2\,500 \text{ r/min}$ 离心 10 min , 分离血清测肝功后置备 -20°C 冷藏。

1.4 血清 sICAM-1 检测 采用双抗体夹心 ELISA 法。将试剂置室温下 30 min 后, 将样本 $1:50$ 稀释后取 $100 \mu\text{L}$ /孔和各