

致。本试验证实:选择 10 mL 作为留样标准,可以避免以上矛盾。

此外,在制备冰冻红细胞的过程中,按比例加入的甘油浓度会影响冻存效果和终产品中的甘油残留量。复方甘油制剂是血站的关键物料之一,为了保证血液质量,除监测血液制品中甘油残留量之外,血站质管部门还应在进货验证中监测复方甘油制剂的甘油含量。建议依照以下流程做监测:复方甘油制剂甘油标识量为 570 g/L,精密量取制剂 10 mL,加生理盐水定容至 100 mL,充分混匀后精密吸取 10 mL,用 1.4.2 方法测定。依据下列公式计算,评价实际测量甘油含量与标识量是否一致。

$$\text{甘油含量 (g/mL)} = \frac{\text{NaOH mL 数 (样品 - 空白)} \times 0.00921 \times \frac{\text{滴定 NaOH 浓度}}{0.1}}{\text{样品 mL 数} \times 10}$$

综上所述,通过作者建立的甘油含量检测方法,可以达到操作简单、准确监控冰冻解冻去甘油红细胞中甘油残留量的目的,此监测流程更符合血站实际工作需要,值得推广并做进一步探讨、规范。

参考文献

[1] 王培华.输血技术学[M].2 版.北京:人民卫生出版社,1998:62-

• 检验技术与方法 •

67.
- [2] 中华人民共和国质量监督检验检疫总局.全血及成分血质量要求(GB 18469-2001)[S].北京:中国标准出版社,2001:7-8.
- [3] 国家药典委员会.中华人民共和国药典二部[S].北京:中国医药科技出版社,2010.
- [4] 刘春燕,张孝山,李浩珑,等.丙酮酸激酶法检测冰冻红细胞解冻后残留甘油含量研究[J].天津医药,2007,35(10):794-795.
- [5] 黄海涛,杨力佳,丁中涛,等.高效液相色谱法测定果酒中的糖、甘油和乙醇[J].云南大学学报,2002,24(5):375-377.
- [6] 林俊杰,徐蓓,邱颖婕,等.冰冻红细胞中甘油残留量不同测定方法的比较[J].中国输血杂志,2002,15(5):323-324.
- [7] 陈均,杨通汉,王云华,等.冰冻红细胞解冻后残留甘油含量测定方法初探[J].中国输血杂志,2004,2(17):97-98.
- [8] 中华人民共和国.卫医发[2012]1 号 血站技术操作规程[S].北京:中华人民共和国卫生部,2012.

(收稿日期:2012-01-05)

溶血对一步法和两步法 HBsAg 酶联免疫试剂检测结果影响的研究

甄志军,李荣雪,张志红
(河北省邢台市中心血站检验科 054000)

摘要:**目的** 探讨样本溶血对一步法和两步法 HBsAg 酶联免疫吸附试验(ELISA)检测结果的影响。**方法** 分别将 60 例阴性标本、弱阳性标本和强阳性标本人为造成不同程度的溶血,比较溶血前后不同试剂检测样本 OD 值的变化差异,分析溶血标本是否对 ELISA 试验存在干扰,一步法和两步法试剂是否存在差异。**结果** 对于阴性标本,一步法试剂 10 g/L 以下溶血样本检测 OD 值与溶血前比较差异无统计学意义($P>0.05$),10 g/L 以上重度溶血后样本孔 OD 值、S/CO 值与溶血前比较差异有统计学意义($P<0.01$);两步法试剂 15 g/L 以下溶血样本检测 OD 值与溶血前比较差异无统计学意义($P>0.05$),15 g/L 以上重度溶血后样本孔 OD 值与溶血前比较差异有统计学意义($P<0.01$);对于弱阳性和阳性标本,两种试剂在 5 g/L 以上溶血后样本检测 OD 值与溶血前比较差异有统计学意义($P<0.01$)。**结论** 两步法试剂受溶血影响较一步法轻,轻度溶血样本对阴性标本 ELISA 试验结果无干扰,对于灰区结果和重度溶血标本需要重新取样,进行再检。

关键词: 肝炎表面抗原,乙型; 溶血; 酶联免疫吸附测定; 试剂盒,诊断

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.15.032

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)15-1864-02

酶联免疫吸附试验(ELISA)是血站系统进行献血者筛查的常用方法之一,检测对标本的要求是:空腹抽血,标本不能溶血。但是在血站日常检验工作中,经常会遇到溶血的标本,国内有许多文献报道溶血对 ELISA 试验有影响^[1-2],会对试验结果产生干扰,但多数是在 2010 年新版《中华人民共和国药典》颁布之前的试剂,2010 年版《中国药典》二部收录了 8 个按药品管理的体外诊断试剂标准。如采用 ELISA 试验原理的产品,均将一步法修改为二步法。在孵育时间方面,都大大加长。在 2010 年 10 月 1 日后,国内试剂厂家按照国家的要求对 ELISA 试剂进行了调整,为了了解溶血标本对改模后国产试剂的影响,作者对改模后的试剂进行了溶血因素对试剂影响的评估,并克服以往对溶血程度没有定量的缺点,采用了不同溶血程度的系列标本。现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2010 年 5~12 月在本站检测乙型肝炎表面

抗原阴性标本 20 例;弱阳性标本(S/CO 值在 1~5 倍)20 例;S/CO $\geq$ 10 的样本 20 例,其中男 34 例,女 26 例。所有标本均无溶血、脂血、黄疸。

1.2 试剂 改模前试剂:厦门新创 HBsAg,批号 2010095114;北京万泰 HBsAg 试剂,批号 BX20100706。改模后试剂:厦门新创 HBsAg,批号 2011015102;北京万泰 HBsAg 试剂,批号 B20101204。

1.3 仪器 BEPⅢ型全自动酶免分析仪;RSP 全自动加样仪;Sunrise 酶标仪(Tecan 公司)。

1.4 方法 60 例标本,按照不同血浆和血细胞的比例配成 4 组不同浓度的标本,并置-20℃冰箱冰冻后融化,使其溶血,配制成 4 组不同游离 Hb 浓度的溶血标本。同一献血者的系列溶血标本及非溶血对照标本,分别用改模前后的两种厂家的试剂进行双孔检测。取双孔的平均 OD 值。实验由同一个操作人完成,严格按照试剂说明书进行操作。结果判断:S/CO

值=样本 OD 值/Cut off,≥1.0 判为阳性,<1.0 判为阴性。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件进行双因素方差分析比较溶血对改模前后试剂检测 OD 值的影响。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 阴性标本组样本溶血前后 OD 值比较 检测 20 份阴性系列溶血标本,对于一步法试剂:轻度溶血(5 g/L)后样本孔

OD 值与溶血前比较差异无统计学意义,5 g/L 以上溶血后样本孔 OD 值与溶血前比较差异有统计学意义。溶血后样本孔 OD 值随溶血程度加重逐渐增大。对于两步法试剂,中度溶血(10 g/L)后样本孔 OD 值与溶血前比较差异无统计学意义,10 g/L 以上溶血后样本孔 OD 值与溶血前比较差异有统计学意义。溶血后样本孔 OD 值随溶血程度加重逐渐增大,具体结果见表 1。

表 1 HBsAg 阴性标本检测结果 OD 值

组别	旧试剂 1	旧试剂 2	新试剂 3	新试剂 4
对照	0.003 1±0.001 7	0.009 2±0.002 2	0.007 2±0.002 3	0.008 2±0.003 1
5 g/L	0.003 5±0.001 6	0.009 1±0.002 7	0.008 0±0.002 1	0.009 2±0.003 3
10 g/L	0.022 4±0.004 6*	0.023 1±0.004 7*	0.008 9±0.001 7	0.009 2±0.002 6
15 g/L	0.084 4±0.011 6**	0.093 3±0.012 7**	0.016 8±0.002 6*	0.010 2±0.002 3
20 g/L	0.145 0±0.012 9**	0.153 1±0.013 7**	0.103 8±0.003 6**	0.127 2±0.005 3**

*: $P<0.05$,差异有统计学意义;**: $P<0.01$,差异有统计学意义。

表 2 HBsAg 弱阳性性标本检测结果 OD 值

组别	旧试剂 1	旧试剂 2	新试剂 3	新试剂 4
对照	0.122 5±0.015 9	0.131 2±0.015 1	0.258 5±0.050 8	0.279 6±0.051 1
5 g/L	0.147 3±0.014 6*	0.150 1±0.014 9*	0.211 3±0.035 4*	0.221 9±0.040 9*
10 g/L	0.185 1±0.018 6**	0.193 8±0.020 6**	0.248 9±0.050 8	0.258 8±0.056 1
15 g/L	0.220 2±0.025 8**	0.231 2±0.022 9**	0.269 5±0.057 9	0.271 1±0.058 2
20 g/L	0.251 8±0.030 1**	0.260 2±0.031 9**	0.314 8±0.046 6*	0.320 6±0.051 6*

*: $P<0.05$,差异有统计学意义;**: $P<0.01$,差异有统计学意义。

表 3 HBsAg 阳性标本检测结果 OD 值

组别	旧试剂 1	旧试剂 2	新试剂 3	新试剂 4
对照	1.477 1±0.495 9	1.460 2±0.501 6	2.794 6±0.494 6	2.830 6±0.552 1
5 g/L	1.704 6±0.504 6	1.686 6±0.530 1	3.120 9±0.470 9	3.156 2±0.474 9
10 g/L	1.796 5±0.553 8*	1.776 2±0.569 3*	3.313 1±0.592 9*	3.356 2±0.612 8*
15 g/L	1.839 9±0.572 2*	1.802 7±0.589 3*	3.392 2±0.598 8*	3.409 2±0.623 3*
20 g/L	2.395 8±0.601 2**	2.404 1±0.601 2**	3.759 6±0.664 8**	3.825 5±0.603 9**

*: $P<0.05$,差异有统计学意义;**: $P<0.01$,差异有统计学意义。

2.2 弱阳性标本组溶血前后 S/CO 值比较 检测 20 份弱阳性系列溶血标本,对于一步法试剂:轻度溶血(5 g/L)后样本孔 OD 值与溶血前比较差异有统计学意义,并且溶血后样本孔 OD 值随溶血程度加重逐渐增大。对于两步法试剂,轻度溶血(5 g/L)后样本孔 OD 值与溶血前比较,数值降低,差异有统计学意义($P<0.05$),10、15 g/L 溶血后样本孔 OD 值与溶血前比较差异无统计学意义。极重度溶血(20 g/L)后样本孔 OD 值与溶血前比较差异有统计学意义($P<0.05$),具体结果见表 2。

2.3 阳性标本组溶血前后 S/CO 值比较 检测 20 份阳性系列溶血标本,对于一步法试剂和两步法试剂:轻度溶血(5 g/L)后样本孔 OD 值与溶血前比较差异无统计学意义,5 g/L 以上溶血后样本孔 OD 值与溶血前比较差异有统计学意义。溶血后样本孔 OD 值随溶血程度加重逐渐增大,具体结果见表 3。

3 讨 论

用 ELISA 试验检测 HBsAg 是血站系统筛查献血者的常

用方法,此方法分为一步法和两步法两种,一步法检测 HBsAg 有快速简便、具有较高的特异性、灵敏度等优点,是 2010 版中国药典颁布前各级血站实验室常用的试验方法之一,在新版中国药典颁布后,自 2010 年 10 月 1 日起,乙肝表面抗原检测方法由一步法改为两步法,两步法检测 HBsAg 相比一步法具有特异性高、灵敏度高等优点,此两种方法对于标本的质量都有一定的要求,在试剂说明书中,都写明样本溶血对试验方法有一定的影响,都要求标本不可溶血。但在实验室中不可避免会接受到溶血标本,工作中导致标本溶血的原因主要是由于采血、运送、保存及分离血清不当造成的。

标本溶血对 ELISA 检测产生的影响主要有以下几个方面:(1)样本溶血后红细胞内容物如水(64%~70%)、Hb、无机盐、蛋白质等释放对血清有稀释作用。(2)红细胞破碎后释放出来的 Hb 及其他物质非特异性吸附于反应孔壁,并与包被物非特异结合,在洗涤过程中往往难以完全洗脱^[3];Hb 中的亚铁血红素具有类似辣根过氧化物酶活性,其(下转第 1876 页)

控物常存在一定的浊度和价格昂贵等不足之处^[9]。通过对自制糖化血红蛋白质控品的研究,最终配制出配方合理、成本低廉、结果稳定的液体生化质控物。而全血质控物具有稳定性高,价格便宜,可适用于临床作为糖化血红蛋白的质控参考。目前,糖化血红蛋白作为糖尿病筛查、诊断、血糖控制、疗效评估的有效指标,在临床中已得到广泛使用^[10-13]。临床实验室常用的测定 GHb 的方法有 30 余种,依据反应原理不同分为 2 类:第一类基于 GHb 与非 GHb 的电荷不同,包括阳离子交换色谱法、电泳法、等电聚焦法等;第二类基于 GHb 的结构特点,包括亲和色谱法、免疫法等。而作为糖化血红蛋白的金标准,需要高精度的全自动生化分析仪,作为常规方法不利于临床开展。而免疫比浊法可以上全自动生化分析仪,无血红蛋白分离步骤,干扰因素小,特异性和敏感度高,但作为常规项目需要有良好、稳定的质控品定时监控。而全血质控物具有稳定性高,价格便宜,可适用于临床作为糖化血红蛋白的质控参考。通过连续 5 个月的对自制糖化血红蛋白质控物的结果监测,所测得的 HbA1c 值 5 个月均值都很稳定,每个月的 CV 值都小于 2.5%,各个月的检测结果对比差异无统计学意义($P>0.05$)。该 5 个月的总的 HbA1c 值变异低于 5%。自制糖化血红蛋白质控物基本上符合临床使用的要求,是良好的室内质量监测的质控品。说明该质控物的稳定性好,完全能满足室内质评和室内质控的开展和使用。

参考文献

[1] 陈淑云,采云.糖尿病患者 HbA1c 与 C 肽关系分析[J].国际检验医学杂志,2010,31(1):81.

(上接第 1865 页)

作用效应与辣根过氧化物酶类似^[4],催化 H₂O₂ 生成原生态的氧,氧与四氨基联苯胺(TMB)反应生成可溶性蓝色物质出现显色反应^[5]。而其他物质与包被物结合,则可以导致抗原物质与包被物结合减少,从而减弱显色反应。(3) Hb 具有过氧化物酶活性^[6]。总之,溶血标本会对 HBsAg 检测产生非常复杂的影响,随着不同的溶血情况,以上几个因素均有可能占据主导地位,从而导致检测结果出现一定的偏差。本文结果显示,对于一步法试剂,不论标本是阴性弱、阳性还是阳性,溶血标本试验结果 OD 值相比对照标本实验结果 OD 值均不同程度的增加,且随着溶血程度的加重,试验孔 OD 值也逐渐升高,此实验结果证实溶血对一步法试验存在干扰,且在所有情况下,均为正向的影响,导致检测结果偏高^[7]。对于两步法试剂,在标本是阴性时,只有在标本溶血程度很高时,才会对试验结果产生影响,此结果表明:两步法试剂的特异性较一步法高;在标本是弱阳性时,轻度溶血可导致标本 OD 值降低,这种现象可能是由于红细胞内容物对血浆的稀释及内容物中物质与包被物质非特异性结合导致的,出现此种情况,就提醒作者在日常检测工作中,一定要注意 Cut off 值附近的标本,一旦发现溶血标本,一定要重新取样进行再检,以防出现漏检;对于阳性标本,溶血标本试验结果 OD 值相比对照标本实验结果 OD 值均出现较大幅度的增加,且随着溶血程度的加重,试验孔 OD 值也逐渐升高,

从本实验的结果来看,作者发现:两步法试剂的灵敏度和特异性均较一步法试剂有所提高,其抗溶血干扰的能力较强,但是,作者也同时发现,轻中度溶血时,溶血样本可导致 HB-

[2] 瞿良,王惠莹,朱玉琨,等.糖尿病血红蛋白检测的循证检验医学观点[J].国外医学临床生物化学与检验学分册,2005,26(10):718-721.

[3] 王金良.测定血中糖化血红蛋白来诊断糖尿病[J].开卷有益·求医问药,2010,128(3):260-262.

[4] 黎卓华,王希平,李郑,等.利用全血质控物作糖化血红蛋白质控物的探讨[J].检验医学与临床,2007,4(2):91-92.

[5] J. 萨姆布鲁克, E. F. 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯. 分子克隆 II [M]. 2008:861-862.

[6] 牟秀萍,王伶,牟华红,等.自制血清蛋白电泳质控品的应用及其监控作用的评价[J].江西医学检验,2004,22(5):423-424.

[7] 王希平,叶丽燕,李鄂,等.混合血浆制备异常凝血质控物及其稳定性的探讨[J].检验医学与临床,2006,3(5):205.

[8] 叶应妩,王毓三,申子瑜.全国临床检验操作规程[M].3 版.南京:东南大学出版社,2006:59-61.

[9] 段勇,王玉明,赵蕊,等.临床化学检验的液性质控血清的制备研究[J].昆明医学院学报,2003,(2):24-27.

[10] 刘艳梅.糖化血红蛋白糖尿病中的临床应用[J].国际检验医学杂志,2007,28(11):1035-1037.

[11] 戴晓灵.糖化血红蛋白在糖尿病诊治中的应用[J].检验医学与临床,2008,5(6):373-374.

[12] 王笠,李琳,王达,等.糖化血红蛋白的检测和临床应用[J]上海医学检验杂志,2003,18(2):119-121.

[13] 谭琳琳,任君,史新辉,等.糖尿病患者糖化血红蛋白与空腹血糖结果临床分析[J].重庆医学,2008,37(16):1827.

(收稿日期:2012-01-12)

sAg 检验结果偏低,这在一定情况下,有可能导致假阴性,给临床诊断带来了误导,因此检验人员应谨慎对待溶血样本。遇到有溶血样本,如属轻、中度溶血,可以用设置灰区的方式来杜绝漏检,对灰区标本重新取样检测,以得到准确结果,对避免漏检情况的发生有重要意义;对重度溶血样本则视为不合格样本,应及时重新取样,以免产生假阳性结果,导致宝贵血液资源的浪费。

参考文献

[1] 王碧玉,黄芳.溶血对临界阴性 HBsAg 结果的影响及抗溶血因素干扰的研究[J].广西医学,2011,33(9):1174-1175.

[2] 谭有为,贾夫峰,张峰.无偿献血者溶血标本对检验结果的影响[J].临床输血与检验,2010,12(2):145-146

[3] 陆仁飞.溶血标本对乙型肝炎病毒表面抗原检测结果的影响[J]检验医学与临床,2008,5(17):1065-1066.

[4] 周峰,宋忠琴.不同程度的溶血标本和带血球标本对酶联免疫吸附试验一步法检测乙肝病毒血清标志物的影响[J].实用医技杂志,2006,13(22):3966-3967.

[5] 牛利茹,毕亚丽,李金伟.血标本溶血对检验结果的影响及防范对策[J].临床误诊误治,2005,18(9):691-692.

[6] 岳献荣,孟毓.酶联免疫吸附试验检测各环节中应注意的问题[J].中国临床研究,2010,23(2):150-151.

[7] 陈志坚,梁余莉.标本溶血对 ELISA 检测乙肝表面抗原的影响[J].广西医学,2006,28(9):1437-1438.

(收稿日期:2012-01-10)