

计表明两者之间差异无统计学意义($\chi^2=5.5, P>0.01$)。

表 2 血清学方法与 PCR 方法结果比较

血清学方法	FQ-PCR 法		合计
	阳性	阴性	
阳性	5	17	22
阴性	5	66	71
合计	10	83	93

3 讨 论

肺炎支原体感染由于其临床症状不典型,很难确诊。传统 MP 分离培养是诊断的“金标准”,但其难度大、耗时长(2~3 周)且敏感性一般,对标本运送及培养基的要求高,故未能普遍应用^[6]。检测肺炎支原体抗体方法比培养法更简单、更敏感。但是由于 IgM 抗体在发病 5~7 d 才产生,病程早期假阴性率较高,不能达到及时诊断的目的。同时检测结果也受患者年龄、免疫力等因素的影响。PCR 法具有很高的特异性、敏感性,但其要求操作技术高,仪器设备昂贵,不适合一般实验室开展。本文数据显示,快速液体培养法、PCR、血清学试验阳性率分别为 17.2%、10.7%和 23.6%,统计学处理分析表明这 3 种方法检测结果都无明显差异,见表 1。

检测 MP 快速液体培养基中主要含支原体基础肉汤、马血清、酵母提取液、培养基内加抑菌剂,可抑制细菌和真菌的生长,快速液体培养法由于其操作简单、实验室条件要求不高、明显缩短检测时间,可应用于临床^[7]。本研究中,研究者对快速液体培养法阳性的标本进行涂片,革兰染色后观察,69.2%(36/52)发现霉菌或细菌,假阳性率非常高。说明快速液体培养法液体培养基中的抑菌剂没有有效抑制真菌和细菌,它们的生长使得快速液体培养法出现假阳性^[8-9]。因此,快速液体培养法结果判断时结合显微镜检查,可排除细菌或真菌等导致的假阳性,与血清学检测、PCR 检测结果比较差异无统计学意义($P>0.01$)。

综上所述,肺炎支原体液体快速培养基鉴定的方法,干扰

• 检验技术与方法 •

用 sysmex CA-7000 血凝仪测量血浆 D-二聚体全量法与减量法的比较

徐正良,李德璇,刘光彩,沈 乾

(云南省第三人民医院/大理学院昆明附属医院检验科,云南昆明 650031)

摘要:目的 为了给临床在深静脉血栓和肺栓塞的排出及 DIC 的诊断和溶栓治疗监测方面有一个很好的评价指标,采用血浆 D-二聚体定量测定具有简便、快捷、安全、无创伤性等优点,但是西部地区经济欠发达,试剂成本昂贵,而收费标准又较低,不能普遍应用。为了降低成本,服务于基层,特做此试验。**方法** 以 CLSI 颁布的 EP9-A2 文件《用患者样本进行方法比对及偏倚评估》^[1]为方案,在 sysmex CA-7000 血凝仪上对血浆 D-二聚体采用全量法和减量法进行检测,以评价二者有无显著差异。**结果** 通过采用两种方法分析 40 例患者样本的血浆 D-二聚体含量,采用线性回归分析结果,以全量法所测得结果为 X,以减量法所测结果为 Y。通过 SPSS 17.0 统计软件处理计算斜率(b)、截距(a)和相关系数(r),分别为 b=0.9772, a=0.032 7, r=0.999 6 及配对 t 检验得 $t_{0.05, 双测} = 2.024, t = 1.646, P > 0.05$ 其结果差异无统计学意义。**结论** 血浆 D-二聚体全量法和减量法对于在仪器线性范围内的测量结果从本实验来看是无显著性差异的,但是超出线性范围的测量是否有相关性还有待进一步的验证。

关键词: 血浆 D-二聚体; 定量检测; 全量法; 减量法

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.03.037

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)03-0344-03

D-二聚体是纤维蛋白单体经活化因子 XIII 交联后,再经纤溶酶水解所产生的一种特异性降解产物,是一个特异性的纤溶过程标记物。D-二聚体来源于纤溶酶溶解的交联纤维蛋白

因素多,影响了其特异性。结果判断时若结合显微镜检查,以排除细菌或真菌等导致的假阳性,该法的特异性可达到与血清学及 FQ-PCR 法一致水平,可以作为肺炎支原体呼吸道感染性疾病实验诊断方法之一。

参考文献

- [1] Lind K, Benzon MW, Jensen JS, et al. A seroepidemiological study of Mycoplasma pneumoniae infections in Denmark over the 50-year period 1946~1995[J]. Eur J Epidemiol, 1997, 13(5): 581-586.
- [2] Nakayama EK, Hasegawa M, Morozumi, et al. Rapid optimization of antimicrobial chemotherapy given to pediatric patients with community acquired pneumonia using PCR techniques with serology and standard culture[J]. J. Infect. Chemother, 2007, 13(2): 305-313.
- [3] Morozumi M, Iwata S, Hasegawa K, et al. Increased macrolide resistance of Mycoplasma pneumoniae in pediatric patients with community-acquired pneumonia[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2008, 52(1): 348-350.
- [4] 张浩. 支原体培养和鉴定方法的探讨[J]. 中国现代医生, 2007, 45(6): 65.
- [5] 钱新红, 张国成, 许东亮. 肺炎支原体快速鉴定培养基在儿童支原体感染快速诊断中的应用[J]. 现代检验医学杂志, 2006, 21(5): 71-72.
- [6] Yamazaki T, Narita M, Sasaki N, et al. Comparison of PCR for sputum samples obtained by induced cough and serological tests for diagnosis of Mycoplasma pneumoniae infection in children[J]. Clin Vaccine Immunol, 2006, 13(6): 708-710.
- [7] 张善弟, 张驰. 肺炎支原体快速鉴定培养基的临床应用及结果分析[J]. 现代检验医学杂志, 2010, 25(4): 97-98, 101.
- [8] 刘长德, 张艳, 于成源, 等. 支原体培养假阳性结果原因分析[J]. 中华检验医学杂志, 2006, 29(3): 214.
- [9] 吕泰霞, 赵水娣. 肺炎支原体液体培养假阳性原因分析及解决方法探讨[J]. 实验与检验医学, 2009, 27(3): 323-324.

(收稿日期:2012-10-03)

凝块^[2]。其含量增高表明体内有血栓形成及纤维系统的激活,可以作为体内血栓前状态和血栓形成的分子标志物之一。应用定量检测血浆中 D-二聚体的含量具有简便、快捷、安全、无

创伤性等优点,目前在临床中广泛应用。但是由于试剂成本昂贵,尚不能在经济欠发达的西部地区广泛推广。因此本文就血浆 D-二聚体定量检测全量法与减量法的结果比较报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 (1)检测对象:检测对象为本院住院患者 40 例,男 24 例,女 16 例,平均年龄 51.9 岁。(2)标本处理:每日收集本院住院患者采用枸橼酸钠抗凝(1:9)血标本 8 例,标本要求抗凝比例符合要求,尽量避免标本溶血、脂血和黄疸。标本采集后尽快离心,并在 4 h 内测试完毕^[3]。

1.2 仪器与试剂 日本 sysmex CA-7000 血凝仪。INNOVANCE D-Dimer REAGENT(乳胶试剂)4.0 mL; INNOVANCE D-Dimer DILUENT(稀释液)5.0 mL; INNOVANCE D-Dimer BUFFER(缓冲液)5.0 mL; INNOVANCE D-Dimer SUPPLEMENT(封闭液)2.6 mL; INNOVANCE D-Dimer(校准品)2×1.0 mL。

1.3 方法

1.3.1 血浆 D-二聚体定量检测全量法 按照厂家要求设置 D-Dimer 各试剂用量设为 INNOVANCE D-Dimer REAGENT(乳胶试剂)56 μL; INNOVANCE D-Dimer DILUENT(稀释液)32 μL; INNOVANCE D-Dimer BUFFER(缓冲液)60 μL; INNOVANCE D-Dimer SUPPLEMENT(封闭液)24 μL,标本用量为 16 μL。完成试剂及标本用量后,按照 1.1.2 标本处理,要求选 8 例不同 D-Dimer 浓度水平的患者血浆,按照血凝仪 sysmex CA-7000 具体上机操作流程分别从 1 到 8 和从 8 到 1 各测定一次。按照上述操作持续 5 天,共测试 40 例标本。如果按照上述试剂用量操作则理论上每套试剂可以做 71 次测试。

1.3.2 血浆 D-二聚体定量检测减量法 在 sysmex CA-7000 血凝仪把 D-Dimer 各试剂用量设为 INNOVANCE D-Dimer REAGENT(乳胶试剂)45 μL; INNOVANCE D-Dimer DILUENT(稀释液)26 μL; INNOVANCE D-Dimer BUFFER(缓冲液)50 μL; INNOVANCE D-Dimer SUPPLEMENT(封闭液)20 μL,标本用量为 13 μL。设完试剂及标本用量后,按照 1.1.2 标本处理要求选 8 例不同 D-Dimer 浓度水平的患者血浆按照血凝仪 sysmex CA-7000 具体上机操作流程分别从 1 到 8 和从 8 到 1 各测定一次。按照上述操作持续 5 天,共测试 40 份标本。如果按照上述试剂用量操作则理论上每套试剂可以做 88 次测试。

1.4 统计学处理

1.4.1 通过对 40 例标本 80 个结果处理,以全量法所测得结果为 X,以减量法所测结果为 Y 在 SPSS 17.0 统计软件上,采用线性回归分析计算相关系数 r、斜率 b 及截距 a。如果相关系数 $r \geq 0.975$ 或 $r^2 \geq 0.95$,则说明 Y 值是可接受的。

1.4.2 另外采用配对 t 检验分析截距与 0 是否存在统计学意义,如无统计学意义,且斜率 b 在 1 ± 0.05 范围内,说明在某一浓度范围内两者是呈线性关系的。另外由于重复测定 1 次共计测定 40 例样本,故自由度 $v = 38$ 查 t 界值表得 $t_{0.05, 38} = 2.024$ 。如 $t < t_{0.05, 38}$,则 $P > 0.05$ 说明血浆 D-二聚体定量检测全量法与减量法其结果差异无统计学意义。

2 结果

血浆 D-二聚体定量检测全量法与减量法的比较结果见表 1。通过表 1 用 SPSS 17.0 统计软件可得线性回归方程的斜率 $b = 0.977$ (在 1 ± 0.05 内),相关系数 $r = 0.996 > 0.975$,截距 $a = 0.0327$ 。配对 t 检验得 $t = 1.646$;当自由度 $v = 38$ 时

查 t 界值表得 $t_{0.05, 38} = 2.024$ 。 $t < t_{0.05, 38}$,则 $P > 0.05$ 截距与 0 差异无统计学意义。这说明 sysmex CA-7000 血凝仪在仪器的线性范围(0~10 mg/L)内血浆 D-二聚体定量检测全量法与减量法是差异无统计学意义的。

表 1 血浆 D-二聚体定量检测全量法与减量法的比较

样本号	全量法(X)		减量法(Y)		全量法均值	减量法均值
	结果 1	结果 2	结果 1	结果 2		
1	0.29	0.28	0.33	0.31	0.285	0.32
2	0.68	0.69	0.69	0.7	0.685	0.695
3	0.19	0.18	0.18	0.2	0.185	0.19
4	7.42	7.38	6.93	7.12	7.4	7.025
5	1.52	1.51	1.5	1.51	1.515	1.505
6	0.53	0.53	0.51	0.53	0.53	0.52
7	8.79	8.65	8.3	8.35	8.72	8.325
8	1.2	1.18	1.21	1.23	1.19	1.22
9	1.39	1.41	1.37	1.39	1.4	1.38
10	2.13	2.15	2.14	2.12	2.14	2.13
11	0.16	0.16	0.16	0.15	0.16	0.155
12	4.44	4.47	4.51	4.49	4.455	4.5
13	0.75	0.74	0.76	0.75	0.745	0.755
14	1.5	1.52	1.51	1.53	1.51	1.52
15	3.78	3.76	3.79	3.75	3.77	3.77
16	7.04	7.1	7.03	7.08	7.07	7.055
17	0.9	0.91	0.88	0.9	0.905	0.89
18	0.72	0.71	0.73	0.7	0.715	0.715
19	1.26	1.25	1.26	1.26	1.255	1.26
20	3.04	3.08	3.06	3.05	3.06	3.055
21	0.88	0.89	0.87	0.88	0.885	0.875
22	0.68	0.68	0.7	0.69	0.68	0.695
23	4.19	4.18	4.2	4.19	4.185	4.195
24	8.35	8.32	8.12	8.14	8.335	8.13
25	3.19	3.2	3.18	3.21	3.195	3.195
26	1.41	1.4	1.42	1.41	1.405	1.415
27	0.94	0.95	0.95	0.96	0.945	0.955
28	0.15	0.15	0.14	0.15	0.15	0.145
29	0.48	0.47	0.47	0.49	0.475	0.48
30	3.53	3.51	3.52	3.51	3.52	3.515
31	0.68	0.67	0.67	0.69	0.675	0.68
32	5.02	5	5.01	4.98	5.01	4.995
33	0.53	0.55	0.54	0.53	0.54	0.535
34	5.29	5.31	5.3	5.29	5.3	5.295
35	0.27	0.27	0.26	0.27	0.27	0.265
36	7.17	7.14	7.16	7.2	7.155	7.18
37	3.35	3.34	3.33	3.32	3.345	3.325
38	3.67	3.64	3.63	3.65	3.655	3.64
39	0.63	0.62	0.64	0.64	0.625	0.64
40	0.34	0.36	0.33	0.31	0.35	0.32

3 讨论

D-二聚体(D-Dimer)是交联纤维蛋白(Fb)在纤溶酶的作用下水解产生的特异性降解产物,其水平的升高反映高凝状态和继发纤溶亢进,D-二聚体的含量变化可以作为体内高凝状态和纤溶亢进的标志物质^[4]。D-二聚体检测以简便、快捷、经济、安全、无创伤性为特点,其高度的敏感性和阴性预示能力,在深静脉血栓和肺栓塞的排除,DIC 的诊断及溶栓治疗监测等方面具有良好的应用价值。是目前国内大、中型医院纷纷开展的检测项目,尽管其诊断的特异性并不高,但是该实验既有的高度的敏感性和阴性预期能力,使其在许多疾病的诊断中,特

别是在血栓形成(高凝状态)^[5]、肝脏疾病和恶性肿瘤^[6]等疾病的鉴别诊断和治疗监测方面具有较好的应用效果。

检测 D-二聚体的方法建立于 1983 年,采用免疫学原理检测抗原的含量,检测法有乳胶凝集法、酶联免疫法、免疫比浊法等^[7],其中乳胶凝集法既有快速、简便的优点,但是只能定性或半定量,小型基层医院即可开展,但是其精密度较差,而且不同批号间差异较大。酶联免疫吸附法(ELISA):特异性强,结果精确,敏感性较高,可进行定量测定,但费时,不适合急诊应用。胶体金免疫渗透法(GIA):简便、快速,也可定量,单个或成批标本可随时检测。目前,随着经济及科技的发展,一种 D-二聚体全定量测定逐渐被一些大型医院相继引进,该仪器采用激光光源(或其他光源)全定量测定,微电脑控制,单点或两点定标,操作方便,结果更加准确可靠。但是由于 D-二聚体是个多聚体片段,导致各种检测方法所检测的片段不一致从而导致了检测结果之间的差异较大,很难标准化。所以本文采用的方法仅能用于 sysmex CA-7000 血凝仪,且试剂仅限于西门子医疗诊断公司生产的 INNOVANCE D-Dimer 试剂。而且只限于在 sysmex CA-7000 血凝仪上设置的 D-二聚体线性范围内使用,至于超出线性范围两者是否有相关性还有待进一步验证。

• 检验技术与方法 •

透射比浊法测定人血纤溶酶原活性的性能评价

陈 武¹,肖 云^{2#},陈振林³,何志成³,李 毅^{1△}

(1. 湖北医药学院附属东风总医院检验部,湖北十堰 442000;2. 湖北医药学院附属人民医院检验科,湖北十堰 442000;3. 广东药学院生命科学与生物制药学院,广东广州 510006)

摘要:目的 探讨利用透射比浊法测定人血浆纤溶酶原(Plg)活性。方法 人血浆 Plg 经腺激酶(uPA)激活后,与含 1% 脱脂奶粉的低熔点琼脂糖混合,加入 96 孔板,600 nm、30 分钟终点法测定透光率计算人血 Plg 水平;采用重复试验、干扰试验、回收试验进行评价;并分别检测健康体检人群($n=30$)、糖尿病患者($n=25$)、冠心病患者($n=23$) 血浆 Plg 水平。结果 显示该方法批内变异系数平均为 4.0%;批间均值无显著差别($P=0.0018$)。葡萄糖有正干扰,尿素负有干扰,平均回收率为 90.6%。健康体检人群、糖尿病患者、冠心病患者血浆 Plg 水平分别为 (3.64 ± 0.22) U/mL、 (2.86 ± 0.35) U/mL、 (2.34 ± 0.31) U/mL,3 组之间有显著差别($F=132.26, P=0.000$)。结论 该方法可用于检测人血 Plg 活性,糖尿病、冠心病患者血浆 Plg 活性较健康体检人群低。

关键词:乳制品; 散射测浊法和比浊法; 纤维蛋白溶酶原; 冠心病; 糖尿病

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.03.038

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)03-0346-03

纤溶酶原(Plg)是人血液中的一种重要糖蛋白,经组织纤溶酶原激活物(tPA)激活为纤溶酶(Plm)后,通过水解纤维蛋白精氨酸-赖氨酸肽键,发挥纤溶与栓溶作用。血浆 Plg 活性下降多见于肝硬化、血栓症前期、弥漫性血管内凝血^[1]。近来研究表明,Plm 不仅发挥纤溶作用,还通过与细胞表面的蛋白酶激活受体(PAR)、annexin A2 等作用,激活巨噬细胞、血小板、血管内皮细胞,参与炎症反应、动脉粥样硬化斑形成和肿瘤迁移等过程^[2-3]。因此人血 Plg 活性的检测对了解发病机制及疾病诊断具有重要意义。

目前人血浆 Plg 活性主要采用底物显色法检测^[1,4]。生物制药中筛选产纤溶酶菌株及纯化监测多采用纤维蛋白板法^[5]和气泡法^[6]进行半定量分析。本研究探讨了以脱脂奶粉作为底物,通过 96 孔板透射比浊法测定人血 Plg 活性。

1 材料与与方法

1.1 材料 牛血浆 Plg 标准品(12U/支)购自上海瑞齐生物

参考文献

- [1] Wayne. CLSI. EP9-A2. Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples: Approved Guideline-second edition[S]. USA:CLSI,2002:1-35.
- [2] 李帅,吕时铭,汤杰英. 浙江地区汉族孕产妇 D-二聚体参考区间的建立及应用[J]. 中华检验医学杂志,2011,34(7):580-585.
- [3] 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,2006:234-235.
- [4] 门剑龙,任静. D-二聚体临床应用及标准化分析进展[J]. 中华检验医学杂志,2010,33(8):793-796.
- [5] Eng CW, Wausaicheong G, Gob SK, et al. Exclusion of acute pulmonary embolism: computed tomography pulmonary angiogram or D-dimer[J]. Singapore Med J, 2009, 50(3): 403-406.
- [6] Ay C, Pabinger I. Testa predictive of thrombosis in cancer[J]. Thromb Res, 2010, 125(1): S12-15.
- [7] 栾耀芳. 血浆 D-二聚体检测方法及临床应用[J]. 医学检验与临床, 2007, 18(4): 61-62.

(收稿日期:2012-09-23)

科技有限公司;uPA 冻干粉(100 000U/支)为北京赛生药业有限公司产品,低熔点琼脂糖购自美国 Amresco 公司,脱脂奶粉为伊利公司产品(批号:6512196);电热恒温水浴锅 HH-4 购自上海升利测试仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 透射比浊法检测 Plg 活性的标准曲线 以 0.02 mol/L Tris-HCl(pH7.4)缓冲液分别配制 2% 脱脂奶粉反应底物液 10 mL、2% 低熔点琼脂糖溶液 10 mL,后者于微波炉加热煮沸 1 min,两者放入 80 °C 水浴锅 30 min,混合后冷却至 60 °C,加入 uPA 40 000 U,迅速混匀即为预反应液。将预反应液分装到 EP 管(60 °C 水浴锅预热),每支 270 μL,再分别加入牛血 Plg 标准品(60 U/mL)0、7.5、15.0、22.5、30.0 μL,使其终浓度分别为 0、1.5、3.0、4.5、6.0 U/mL,不足 30.0 μL 者以 0.02 mol/L Tris-HCl(pH7.4)缓冲液补齐。各管混匀后取 200 μL 加入 96 孔板中,37 °C 恒温箱反应 10 min,酶标仪 610 nm 波长