

3 讨 论

凝血四项用于术前凝血功能障碍的筛查,还用于出血性和血栓性疾病的常规检测以及抗凝药物使用效果的监控。结果的准确性尤为重要。检验医学飞速发展,先进仪器的应用使得实验中的质量得到高水平的控制,误差水平很低,能够满足临床的需求。而实验室前的因素是导致结果准确度下降,误差水平超过临床可接受范围的主要原因。凝血四项标本抽取后如果不摇匀或摇匀不充分,使血标本未与抗凝剂充分混合,则会出现凝固或小凝块,血液凝固或血中有微小凝块导致凝血因子消耗过多是引起凝血四项异常的原因之一^[1]。血液离体后即开始发生变化,会随着存放方式和时间的不同,凝血因子会逐渐消耗而使检验结果改变。低温下会损伤血小板和活化部分凝血因子,使 PT、APTT 结果缩短,因此标本在正确采集并准确核对后,需在室温下立即送检,不宜冷藏,应在抽血后 3h 内检测完毕。试验发现:血液标本的放置时间对测定结果的影响,可以使 TT 时间缩短、APTT 的测定时间延长^[2]。大量的研究认为抽血量对凝血四项检测结果产生重大影响^[3-4]。ICSH 规定凝血四项所用抗凝剂为 109 mmol/L 枸橼酸钠,与全血比例为 1:9,且规定当红细胞比容超出 0.2~0.55 范围要对抗凝剂的量进行调整^[5]。抗凝剂过多则会抑制凝血因子和对血液进行了稀释导致结果延长和纤维蛋白原的减低,反之则会导致结果缩短和纤维蛋白原的升高。分析这个全血比例 1:9,不能代表血浆与抗凝剂比例为固定值,因为健康人群男女红细胞比容正常范围在 0.35~0.55 之间,换算成抗凝剂与血浆的比例分别是 1:[0.9×(1-0.35)]和 1:[0.9×(1-0.55)],即 1:5.85 和 1:4.05,则纤维蛋白原理论上两者之比为 136%(6.85/5.05),差异超过临床可接受范围。抽血量的不准确和红细胞比容的不同导致最终的血浆稀释比例不固定,使得凝血四项的结果不准确,有研究表明全血 1:8 稀释 TT 即会延长,全血 1:6 稀释则凝血四项均有改变^[6]。为改变这种差异,尝试用烘干的抗凝剂代替液体试剂,排除了血浆稀释的可能,使得结果更准确。结果显示 PT、APTT 差异有统计学意义($P<0.05$),TT 两组之间比较差异无统计学意义($P>0.05$)。PT 相对误差为 4.5%(0.5 s/11 s),APTT 相对误差为 6.1%(1.7 s/27.9 s),TT 相对误差为 -2.66%(-0.

5s/19.5s),FIB 相对误差为 7.5%(0.21 g/L/2.79 g/L)均在美国国家临床实验室标准委员会(CLSI)提出的 PT、APTT、TT、FIB 的总允许误差范围之内(分别为靶值的±15%、靶值±15%、靶值±15%和靶值±25%)^[7]。各实验室按要求均需建立自己的对照值,且 PT 结果需超过对照 3 s 以上,APTT 结果需超过对照 10 s 以上才有意义,试验组与对照组 PT 均值未超过 1 s,APTT 均值未超过 2 s,不会引起超过医学决定水平的误差。FIB 两组数据高度相关, r 为 0.926,说明两组之间有一系统误差,这一系统误差是由于稀释和未稀释引起的比例误差,本对照组 FIB 均值与试验组 FIB 均值之比为 0.93(2.79 g/L/3.00 g/L),可以作为矫正系数。从结果看出试验组 PT、APTT、TT 标准差均小于对照组,FIB 两者相当,说明试验组结果更稳定,离散度更小,与理论推导相符合。

综上所述,烘干的枸橼酸钠抗凝管用于凝血四项的检测优于常规用的普通枸橼酸钠抗凝管,基本不受抽血量和红细胞比容的影响,对于难抽血和红细胞比容高的新生儿科、烧伤科尤其适合使用。

参考文献

[1] 杨保君,李维红,翟灶欣.静脉采血对凝血四项结果的影响[J].白求恩医学院学报,2007,5(1):62-63.
[2] 陈国,梁荣伟.对比试验分析凝血四项检测的影响因素[J].国际检验医学杂志,2012,33(19):2369-2370.
[3] 何卫恒,龙峰,林兵英,等.采血量不准确对凝血四项结果的影响分析[J].医学综述,2009,15(13):2065-2066.
[4] 王楚明.人为因素对凝血 4 项检测结果的影响[J].检验医学与临床,2012,9(13):1640-1641.
[5] 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,2006:211.
[6] 王秀明,李志武,孙冀兵,等.不同抗凝比例对凝血四项检测结果的影响研究[J].河北用药,2012,34(20):3161-3162.
[7] Medicare M. CLIA programs: regulations implementing the Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988 (CLIA) [J]. Fed Regist,1992,57(40):7002-7186.

(收稿日期:2013-02-18)

不同稀释及洗板方式对竞争法检测乙肝核心抗体结果的影响

邹映东,林 云,张兴宗,周 芳,豆银芯
(云南省中医医院检验科,云南昆明 650021)

摘要:目的 采用仪器法和手工法进行人机结合及人机比对,探讨仪器稀释方法与手工稀释方法、仪器洗板与手工洗拍板对酶联免疫吸附实验竞争法检测乙型肝炎病毒核心抗体结果的影响。方法 采用不同方式对同一批样本进行检测,分析样本稀释和洗拍板环节不同而其他实验条件一致的情况下,单一因素对实验结果的影响。结果 仪器稀释与手工稀释方法检测结果差异有统计学意义($P<0.05$);自动洗板与手工洗拍板,检测结果差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 洗板环节及不同手工稀释方法对检测结果无影响,仪器自动稀释与手工稀释检测结果存在明显差异。

关键词:酶联免疫吸附测定; 乙型肝炎病毒核心抗体; 竞争法; 稀释

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.12.037

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)12-1569-02

酶联免疫吸附试验(ELISA)竞争法是检测核心抗体的常用方法,因方法简便,速度快捷而在临床实验中普遍应用,但用该方法进行核心抗体批量检测常常出现假阳性^[1]。本文通过

仪器法和手工法进行人机结合及人机比对,探讨仪器稀释与手工稀释、仪器洗板与手工洗拍板对竞争法检测乙型肝炎病毒核心抗体检测结果的影响。

1 材料与方法

1.1 标本来源 随机抽取 2011 年 7~12 月, -20℃ 样本库中保存的 93 份通过时间分辨方法定量检测确认, 无溶血、脂血、黄疸及样本量大于 0.5 mL 的样本。

1.2 仪器与试剂 全自动酶免分析仪为瑞士酶免之星 E-STAR 一体机。试剂: 上海科华生物工程股份有限公司乙型肝炎病毒核心抗体(抗-HBc)检测试剂(批号 201111021)。质控品: 康彻思坦生物有限公司抗-HBc 低值质控品(批号 201109002)。

1.3 方法 通过对仪器进行编程, 针对预稀释环节得到三种实验操作方式。方式 1 和方式 2 采用人机结合方式进行, 预稀释实验环节由实验室资深工作人员进行人工预稀释, 其余检测步骤由仪器自动完成。方式 1: 取 10 μL 血清加入预先准备好的 290 μL 生理盐水中混匀待用; 方式 2: 取 50 μL 血清弃之, 不换 TIP 头, 取 10 μL 血清加入预先准备好的 290 μL 生理盐水中混匀待用; 方式 3 为仪器法: 由仪器吸取 290 μL 生理盐水后再吸取 10 μL 血清加入混匀待用。洗板环节: 由 2 位高年资技师按照日常手工洗板方式完成。洗板方式 1: 甩掉孔内液体, 加入洗液浸泡 30 s, 弃之, 如此重复 5 次, 拍干上机完成余下步骤; 洗板方式 2: 甩掉孔内液体, 加入洗液后弃之, 如此重复 5 次, 拍干后上机完成余下步骤。洗板方式 3: 由仪器直接自动洗板完成全程检测。

1.4 统计学处理 使用 Excel2003 软件对实验数据进行分析处理, 通过 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 不同预稀释加样方式乙肝抗-HBc 检测结果 见表 1。

表 1 不同预稀释加样方式抗-HBc 检测结果比较			
方式	阳性例数(<i>n</i>)	阴性例数(<i>n</i>)	阳性率(%)
稀释方式 1	28	65	30.1
稀释方式 2	27	66	29.0
稀释方式 3	16	77	17.2

2.2 不同洗板方式乙肝抗-HBc 检测结果 见表 2。

表 2 不同洗板方式抗-HBc 检测结果比较			
方式	阳性例数(<i>n</i>)	阴性例数(<i>n</i>)	阳性率(%)
洗板方式 1	17	76	18.3
洗板方式 2	16	78	17.2
洗板方式 3	18	76	19.4

3 讨 论

ELISA 竞争法检测 HBV 抗-HBc 实验简单、实用, 实验条件要求低, 易于操作, 是被广泛应用于临床的经典实验^[2-3]。在此过程中, 加入待检样本与酶标记物的时间应该是同时的, 以保证两者处于一个公平的与固相载体抗原竞争结合的水平。日常手工操作, 进行少量样本检测时加入待检样本与酶标记物的时间基本相同, 检验结果稳定可靠, 假阳性较少。但在日常的检测工作中, 一块完整的 96 人份板手工加样完成常常需要十多分钟甚至二十分钟, 特别是样本量较大时, 几块板加样所需的时间会更长, 假阳性率明显增高^[4-5]。分析原因, 影响因素

众多, 样本稀释、加样、洗板、孵育、显色、终止以及完成每一步骤的时间、温度、加样量的多少, 不同的加样方式, 不同的加样时间, 人工洗板的手法或洗板机洗板精度以及洗板机洗板使用不当等因素, 都有可能是造成检测结果出现假阳性的原因^[6-8]。在上述因素中, 孵育温度、孵育和显色时间为客观因素可控, 加样时间、加样方式以及洗板机精度, 加试剂量、终止反应等环节已被大家重视并易于控制, 而不同的手工稀释方式和洗板方法带来的影响往往容易被大家忽视。

本研究发现, 手工与仪器两种不同稀释方式所得出的检测结果比较差异有统计学意义($P<0.05$), 批量检测中手工稀释方式效率高, 但同时带来假阳性率明显增高, 这说明在实验稀释过程中实验样本稀释有一定的拖带现象, 抗-HBc 浓度被人为加大, 不同的手工稀释方式得出的检验结果比较, 其差异无统计学意义($P>0.05$), 且其阳性率差别较小^[9]。但从检测 S/CO 值来看, 方式 1 稀释方式假阳性部分大多落在灰区, 方式 2 则处于阳性区域, 这说明方式 1 相对方式 2 较可取, 有可改进空间。方式 2 则不可取, 较方式 1 人为明显加大了样本浓度, 缩小了稀释倍数, 造成假阳性率升高。虽然实验室通常对阳性结果做 2 次复查, 对比分析剔除一些不相符的检验结果, 能避免一些假阳性结果的发出, 但实验操作本身带来的一些不确定性, 有一定的风险, 同时不可避免地造成试剂的浪费。3 种洗板方式得出的检测结果证实手工洗板方法和仪器洗板方法无统计学差异, 与文献报道一致^[10-11]。但在实际工作中, 手工洗板时液体喷溅污染和拍板时产生的气溶胶会带来生物安全隐患, 在有条件情况下, 仪器法应为首选方法。

参考文献

[1] 王卓. 改良法检测乙型肝炎病毒核心抗体结果的评价[J]. 中国误诊学杂志, 2009, 9(19): 4573.

[2] 李金明. 临床酶免疫测定技术[M]. 北京: 人民军医出版社, 2005: 188-189.

[3] 杨京民. ELISA 法对乙型肝炎“两对半”检测结果影响因素的分析[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 32(21): 2551-2552.

[4] 王兰兰, 吴健民. 临床免疫学与检验[M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 103-107.

[5] 乔海英, 白莲莲, 赵琳. 加样间隔时间对 ELISA 竞争抑制法检测结果的影响[J]. 实用医技杂志, 2007, 14(15): 2012-2013.

[6] 丁文, 薛庆欢, 吴文金, 等. 人为操作因素对酶联免疫吸附法检测乙肝病毒血清标志物影响的探讨[J]. 中国实验诊断学, 2010, 14(7): 1019-1022.

[7] 成军, 孙玉贵, 成玉生, 等. 不同加样方式对竞争法 ELISA 法检测抗-HBc 的影响[J]. 临床检验杂志, 2008, 26(3): 201-208.

[8] 何瑛, 吴人凤. 加样时差对竞争法抑制法检测抗-HBc 的影响因素探讨[J]. 中国当代医药, 2010, 17(10): 56-57.

[9] 牛勇生, 赵芳. 乙肝两对半检测抗 HBc、抗 HBc 影响因素分析[J]. 中国现代医生, 2008, 46(1): 117.

[10] 成军, 谢珏, 王国政, 等. 乙型肝炎血清学标志物单项抗 HBc-IgG 阳性结果的解释及临床意义[J]. 国际检验医学杂志, 2006, 27(3): 203-205.

[11] 曾怀跃, 杨贵洪. 两种洗板方法在 ELISA 中的应用分析[J]. 实用医技杂志, 2007, 14(14): 1857-1858.