时，血小板一经与破损的血管内皮细胞及组织成分接触，立即以极快的速度黏附于破损的血管壁，而且采集的血标本还要与不光滑的抗凝管表面接触，此时 PLT 黏附在其内壁并发生聚集[2]。因此，无论用何种方法采血，所数得的血小板数，均较血中实际血小板数为低，末梢采血比静脉采血更低，本文实验结果表明（见表 2），静脉采血与末梢采血比较差异无统计学意义（$P>0.05$），但末梢采血影响因素很多，如扎针的深浅，取血的快慢，及挤压手指混进组织液，这些都会影响 PLT 的结果，有条件的都应取静脉血作血细胞分析，对有些基层单位和小孩患者难以做到静脉抽血，必须要末梢采血时，应深扎 3 mm 左右，让血自然流出，确保结果的准确性。

3.3 采用 EDTA-K_2 抗凝的标本，血小板的体积不稳定，血小板的体积随标本的保存时间和保存温度而变化。根据 Ac. T 5diff 仪器分析原理，通常血小板计数阈在 2～25 fL，3～18 fL 是血小板的准确计数阈，18～25 fL 是血小板的漂移阈（可能有干扰），只要血小板直方图分布在 18 fL 以内，血细胞分析仪所测的血小板结果与临床基本吻合。当血小板体积超过 25 fL 时，依照仪器计数的原理，使许多大血小板被当作小细胞而未计入血小板的计数范围，让血小板计数结果偏低。因此在出现血小板计数和直方图异常，以及小红细胞病症的标本时，应及时人工计数，并推片观察，是否有血小板聚集团块和“血小板卫星现象”。

3.4 血细胞分析仪，无论是阻抗法还是光散法，对于血小板数及形态正常的标本，结果一般比较可靠，但对于血小板明显减少或/和形态异常者，所得结果误差甚大，因在病理情况下，血中会出现一些大小近似血小板的所谓“非血小板颗粒”，如小红细胞、红细胞碎片、白细胞片、细菌和真菌以及免疫复合物等，会被当作血小板加以计数，从而使血小板数假性增多。目前已报道准确计数血小板的方法大体上有两类[3]：一类是免疫学方法，即用荧光标记的抗血小板抗体，特异地着染血小板，在流式细胞仪（FCM）或特定的血小板分析仪上计数血小板。二是用二维激光散射测定法，将血小板与“非血小板颗粒”分开，达到准确计数。但这二种方法都需特殊试剂和昂贵仪器，难以在常规工作中普遍推广。对于普通仪器计数血小板出现偏低（$<50\times10^9$/L），血小板直方图出现异常，以及对于确诊血小板数量或/和形态异常的患者标本，目前大多数采用手工计数来复查。由于手工计数其本身不但精密度较差，而且在镜下也往往难以准确辨别血小板与某些“非血小板颗粒”，准确性也不够高，Kunicka 等[4]提出增加一项在血涂片上间接计数血小板的方法作为补充。该法是用抗凝血液推一血片，经瑞氏染色后，在厚薄适中处计数 1 000 个红细胞并同时计数所见到的血小板，求得血小板/红细胞之比值，再将此比值×红细胞数，求得血小板数，此法虽不十分精确，但对于电阻法的仪器或人工法计数血小板，特别对不正常血小板数或/和形态异常的标本，还是相对准确的，同时还能观察血小板的大小、形态、有无聚集及聚集体大小等等，是一种简单易行的方法。除加强质量控制，还需积极加强与临床医生的联系，消除血小板计数结果不真实引起的误诊或漏诊，这对提高检验结果的准确性，更好地服务临床有很重要的作用。

血细胞自动计数仪的引进和使用，促进了血液学检验技术的发展，平时只要注意影响血小板计数减少的相关因素，做到正确使用和分析，必要时进行涂片和直接计数，以确保计数结果的准确性，从而更好地服务于临床。

参考文献

[1] 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，2006：136-137.

[2] 马雨东. 血细胞分析仪测定血小板时抗凝剂等影响因素分析[J]. 检验医学与临床，2010，7(11)：1078-1080.

[3] 刘景香，刘云生. 影响血小板计数因素分析[J]. 中国实用医药，2009，4(8)：226.

[4] Kunicka JE，Fisher G，Murphy J，et al. Improved piatelet Counting Using two-dimensional lass light scatter[J]. Am J clin pathol，2000，114(2)：283-289.

（收稿日期：2013-01-02）

·检验仪器与试剂评价·

两种试剂在 D-二聚体检测中的评价

赵熹君[1,2]，闫　彧[2]，郭维龙[2]，裴媛媛[2]

（1. 内蒙古自治区人民医院检验科，内蒙古呼和浩特 010070；
2. 内蒙古大学生命科学学院，内蒙古呼和浩特 010070）

摘　要：目的　通过上海太阳和德国 Innovance D-Dimer 试剂（Siemens Marburg 产）两种 D-二聚体（D-D）试剂的应用，对凝血标本的检测结果进行比较，分析两种试剂对检测结果的影响。**方法**　采用随机患者抗凝全血标本，按说明操作 CA-7000 血凝仪，进行标本检测，测定 D-D。**结果**　两种试剂对检测结果分析表明，G1 组不存在差异（$t=1.218$，$P>0.05$）；而 G2～G3 组试剂检测结果在统计学上比较存在差异（$t=4.480\ 6$，$P<0.05$）。**结论**　应建立 D-D 检测标准，更好地服务临床工作。

关键词：血凝仪；　纤维蛋白纤维蛋白原降解物；　实验室技术和方法

DOI：10.3969/j.issn.1673-4130.2013.14.049　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1673-4130(2013)14-1878-03

D-二聚体（D-D）检测是临床工作中常用的一种手段，为临床诊断和治疗提供有价值的参考数据，越来越受到医疗工作的重视。1972 年，Gaffney[1] 首先提出 D-D 检测，可作为监测凝血性疾病的“有用的工具”。1983 年，Rylatt 等[2] 首先报道了用单克隆抗体（DD-3B6/22）检测 D-Dimer（乳胶凝集法）。当时被誉为“金标准”。上世纪 90 年代，ELISA 分析法、乳胶增强型免疫分析法等。上世纪 90 年代末到本世纪初，免疫比浊法在凝血仪上实现了自动化检测。使用全自动凝血仪进行 D-D 分析是目前临床最常用的手段，具有操作简便、检测速度快、精确度高的优势；其检测值直接指导临床工作，是患者进行治疗的重要参考指标；对疾病的诊断与治疗有着重要的意义。目前国内报道了大量 D-D 检测相关文献[3-4]，如乳胶凝集法（la-

tex agglutination)、免疫比浊法(liatest DD)、胶体金免疫渗透试验(GIA)定量检测和酶联免疫吸附试验(ELISA)法等;结果均是两种检测方法在结果判定上未见差异[3-5],与国际上报道[6-9]的不同,为此本研究运用 SYSMEX CA-7000 全自动血凝仪,采用不同检测试剂对同一标本进行检测,对测定结果进行分析,现报道如下。

1　资料与方法

1.1　一般资料　采用 106 例本院随机住院患者抗凝全血的标本,运用两种试剂分别对研究标本进行检测,然后对测定结果进行统计学分析研究。

1.2　仪器类型　SYSMEX CA-7000 血凝仪(日本 SYSMEX 公司产)。

1.3　试剂　试剂一:德国德林产 SYSMEX CA-7000 血凝仪 D-D 配套试剂;试剂二:上海太阳产 CA-7000 血凝仪 D-D 配套试剂。

1.4　操作　严格按照按说明书操作程序进行,测定前均采用质控物校正仪器。

1.5　统计学处理　采用 SPSS19.0 软件,配对资料 t 检验法,对检测结果进行统计学分析,$P<0.05$ 为统计学上比较有差异性。

2　结　　果

德国产 Innovance D-Dimer 试剂:采用乳胶增强免疫比浊度法和新一代单克隆抗体 8D3 抗体。试剂:(1)乳胶颗粒包被低压冻干,需蒸馏水复溶;(2)稀释液用于样本稀释、定标稀释;(3)有缓冲液作用添加剂:用于封闭非特异性抗体;(4)缓冲液使信号增强含有聚合碳水化合物的缓冲液。

上海太阳产 D-D 测定采用胶乳免疫比浊法原理:样本中的 D-D 与抗人 D-D 单克隆抗体胶乳颗粒发生抗原抗体反应,产生凝集导致浊度增大。通过检测浊度的变化量,求得样本中 D-D 含量。主要组成成份:(1)D-D R1(含三羟甲基氨基甲烷缓冲液、防腐剂等);(2)D-D R2(含抗人 D-D 单克隆抗体胶乳等);(3)D-D 稀释液(含氯化钠、防腐剂等)。

106 例本院随机门诊、住院患者随机凝血标本,分别采用两种试剂检测,运用 SPSS19.0 版配对资料 t 检验法,对检测数据进行统计学分析,由于 Innovance 试剂组 D-D 检测结果正常参考范围为 0～0.55,而上海太阳试剂组正常参考范围为 0～1,本实验把检测数据分为 3 组,G1 组(0～0.55),G2 组(0.56～1),G3 组(>1)。在进行统计学处理时,分析表明 G1 组不存在差异($t=1.218$,$P>0.05$);而 G2($t=4.330$,$P<0.05$)、G3($t=4.675$,$P<0.05$)组均存在差异,故合并为 G2～G3 组进行分析,两种方法在统计学上比较存在差异($t=4.4806$,$P<0.05$)。所有实验数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,结果见表 1～2。

表 1　G1 组两种方法统计学比较

组别	n	$\bar{x}\pm s$
Innovance 试剂组	52	0.287 0±0.151 1 0
太阳试剂组	52	0.312 5±0.074 1 9

表 2　G2～G3 组两种方法统计学比较

组别	n	$\bar{x}\pm s$
Innovance 试剂组	54	1.125 1±1.594 8 1*
太阳试剂组	54	1.728 6±2.626 1 8

*:$P<0.05$,与太阳试剂组比较。

3　讨　　论

D-D 是交联纤维蛋白的特异性降解产物,其生成或增高反映了凝血和纤溶系统的双重激活,可作为体内血栓形成的重要指标之一,也是目前鉴别原发性和继发性纤溶以及监测溶栓治疗等方面颇有价值的重要指标。在临床上,对血栓形成性疾病如:弥散性血管内凝血(DIC)、深静脉血栓形成(DVT)、肺栓塞(PE)、脑血管疾病、心肌梗死、重症肝炎等均有重要的诊断价值。D-D 在 DIC 的诊断和病程监测上具有良好的应用价值。在 DIC 形成早期即有 D-D 升高,而且随病程的发展,D-D 可持续升高达 10 倍以上。因此,D-D 可作为 DIC 早期诊断和病程监测的主要指标。高灵敏度检测 D-D 是发展趋势。

目前有超过 30 多种检测方法和 20 多种单抗被被应用于临床,大体上可分为两种情况:一种是以欧美产品为代表,其特点是灵敏度高,检测范围相对较窄。另一种是以日本产品为代表,主要是用于 DIC 诊断,其特点是灵敏度相对较低,检测范围较宽无统一的国际标准。

不同抗体对 D-D 不同片段有不同的亲和力,不同的试剂有不同的干扰情况。不同试剂间差异非常显著。无统一的国际标准。低敏方法导致许多病理状态无法及时反映。《急性肺血栓栓塞症诊断治疗专家共识》中推荐了高敏感度的方法,国际上目前已经开始逐渐推动高敏方法。原方法敏感度低,阳性率低,临床与既往的使用经验不符;新方法敏感度高,阳性率高。但 D-D 片段异源性的问题常常被忽略,制备单克隆抗体,针对的只是某类型 D-D。病理过程中可产生多种类型 D-D,由于不同检测试剂只测定其中某种类型,而非降解片段的全部,因此各类试剂在对同一标本进行测定时,其敏感性显著不同[7-8]。D-D 在深静脉血栓、肺栓塞(早期排除诊断)DIC 的早期诊断和动态监测外科手术后的血栓监测妊高征、先兆子痫的监测恶性肿瘤、白血病早期识别、血栓监测肝脏疾病(重症肝炎、肝硬化)肾脏疾病(肾病综合征、肾移植术后)溶栓治疗评估及血栓复发的监测心血管疾病病情评估(心力衰竭、房颤、旁路手术)脑梗死鉴别和治疗监测作为继发性纤溶亢进的标志性物质。

采用两种试剂检测对 106 例本院随机门诊、住院患者随机抗凝血标本的检测,统计学分析表明,在统计学上 G1 组无统计学差异($t=1.218$,$P>0.05$);而 G2($t=4.330$,$P<0.05$)、G3($t=4.675$,$P<0.05$)组均存在统计学差异,故合并为 G2～G3 组进行分析,两种方法在统计学上比较存在差异($t=4.4806$,$P<0.05$)。笔者推测是由于上海太阳产 D-D 测定采用胶乳免疫比浊法,试剂含单克隆抗体胶乳颗粒,可能只对 D-D 中某一抗体产生反应,而德国产 Innovance D-D 试剂采用乳胶增强免疫比浊度法和新一代单克隆抗体 8D3 抗体,并且含有缓冲液作用添加剂,可用于封闭非特异性抗体。所以在G2～G3 组中检测结果存在差异。为此笔者希冀尽快建立全国统一的 D-D 检测标准,同样对检测试剂要求相同的准入制度,只有这样,才能更好地服务检测、临床及全社会。同时本研究结果为今后的 D-D 检测提供一定的参考。

参考文献

[1] Gaffney PJ. Localisation of carbohydrate in the subunits of human fibinogen and its plasmin induced fragments[J]. Biochim Biophys Acta, 263(2): 453-458.

[2] Rylatt DB, Blake AS, et al. An immunoassay for human D dimer using monoclonal antibodies[J]. Thromb Res, 1983, 31(6): 767-778.

[3] 陆小军,何福生,彭黎明. 血浆 D-Dimer 两种检测方法的比较[J]. 中国实验诊断学,2001,10(5):239-240.
[4] 邢晓光,杨晨. 胶体金免疫渗透试验定量检测 D-dimer 评价[J]. 天津医科大学学报,2004(3):436-438.
[5] 刘汉,景本年,李卓江. 健康人不同年龄组血浆 F1+2 及 D-Dimer 检测的意义[J]. 临床检验杂志,2001,19(2):120-121.
[6] Wolfgang K, Walter R. Latex-enhanced immunoturbidimetry allows D-Dimer determination in plasma and serum samples[J]. Clin Chem, 2000, 46(6): 871-872.
[7] Brown M, Lau J, Nelson RD, et al. Turbidimetric D-dimer test in the diagnosis of pulmonary embolism: a metaanalysis[J]. Clin Chem, 2003, 49(4): 1846-1853.
[8] Di Nisio M, Squizzato A, Rutjes AW, et al. Diagnostic accuracy of D-Dimer test for exclusion of venous thromboembolism: a systematic review[J]. J Thromb Haemost, 2007, 5(2): 296-304.
[9] Gosselin RC, Owings JT, Jacoby RC, et al. Evaluation of a new automated quantitative D-Dimer, Advanced D-Dimer, in patients suspected of venous thromboembolism[J]. Blood Coagu Fibrinol, 2002, 113(4): 323-333.

(收稿日期:2013-01-02)

·检验仪器与试剂评价·

两种国产乙型肝炎病毒核酸定量试剂盒检测结果分析

吴 斌,李彩东,李惠军,田鹏飞,段正军,杨小锲,胡 鹏
(甘肃兰州市第二人民医院肝病研究所,甘肃兰州 730046)

摘 要:目的 探讨两种国产乙型肝炎病毒核酸(HBV DNA)荧光定量试剂(PCR-荧光探针法)的临床应用价值。**方法** 收集 411 例慢性乙型肝炎病毒感染者(CHB)血清标本,分别用两种国产乙型肝炎病毒 PCR 试剂检测其 HBV DNA 载量。比较分析 A 试剂(煮沸法)和 B 试剂(免核酸提取的"一步法")的线性范围、准确性和灵敏度。**结果** 411 例 CHB 血清标本用两种试剂检测,结果均大于 5.00×10^2 IU/mL 的标本 155 例,阳性率一致性为 100%,阴性率一致性为 73.8%,总一致性为 83.7%。对两种试剂检测均阳性(>5.00×10^2 IU/mL)的标本取对数值后,均值差异有统计学意义($P<0.05$)。但在低病毒载量组中结果相差较大,67 例经 A 试剂检测结果为阴性(<5.00×10^2 IU/mL)的标本经 B 试剂检测结果为阳性(>5.00×10^2 IU/mL),B 试剂检测的阳性率高于 A 试剂。A 试剂的最低检测限为 5.00×10^2 IU/mL,而 B 试剂的最低检测限为 1.00×10^2 IU/mL,B 试剂的灵敏度高于 A 试剂。**结论** 两种国产的核酸定量 PCR 试剂盒对于检测 HBV DNA 载量在低复制水平的血清标本具有很好的可比性。免核酸提取的"一步法"B 试剂扩增效率高、操作简便、定量结果准确、线性范围广等优点,具有较好的临床应用价值及发展前景。

关键词:肝炎病毒,乙型; 病毒载量; 聚合酶链反应; 试剂盒,诊断
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.14.050 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2013)14-1880-02

乙型肝炎病毒核酸(HBV DNA)是反映 HBV 复制活跃程度及传染性的最直接指标,也是观察抗病毒药物疗效、预后和指导抗病毒药物应用的重要指标之一,HBV DNA 定量检测从根本上突破了免疫学方法等间接方法的局限性,通过直接检测病毒核酸水平,可真实地反映患者体内病毒的水平。HBV DNA 定量检测的方法主要有两类,一类是以聚合酶链反应(PCR)为基础如实时荧光定量 PCR(FQ-PCR)等;另一类是以核酸杂交为基础如斑点杂交和液相杂交等,荧光定量 PCR 检测 HBV DNA 现已成为监测乙肝病毒复制最常用的检测手段。目前,国内生产的乙型肝炎病毒 DNA 定量 PCR 试剂有多种,但这些试剂在检测的灵敏度、特异性、定量准确性和低病毒载量检测的精密度等方面存在差异[1]。近年来,随着基因检测技术的不断完善和规范化,基因诊断在疾病的诊断和监测中发挥着日益重要的作用。核酸的质量是分析成功的先决条件,因而核酸提取是基因诊断实验成败至为关键的步骤[2]。提高 HBV DNA 定量试剂盒检测的灵敏度对乙型肝炎的早期诊断具有重要意义[3-5]。HBV DNA 实验室定量检测有助于确定感染者的状态,对确定是否开展抗病毒治疗及适宜抗病毒治疗的方案至关重要[6]。为此,本研究选用国内两家生物技术公司生产的乙型肝炎病毒核酸定量检测试剂盒对 411 例慢性乙型肝炎患者血清 HBV DNA 进行定量检测,比较两种试剂检测的阳性率、线性范围、灵敏度以及试剂提取方法的特点和临床应用价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 随机选取 2012 年 8~12 月期间来本院就诊的慢性乙型肝炎患者 411 例,门诊 314 例,住院 97 例。男 292 例,女 119 例,年龄(39.5±13.4)岁,平均年龄 39.5 岁。无合并其他肝炎病毒感染,同时排除药物性、酒精性、其他病毒性肝炎。诊断符合 2010 年 12 月 10 日中华医学会肝病学分会与中华医学会感染病学分会修订的《慢性乙型肝炎防治指南》中的诊断标准[7]。所有标本清晨空腹抽取静脉血 5 mL,室温静置,离心后立即分离血清-80 ℃低温保存待检。

1.2 试剂与试剂 乙型肝炎病毒核酸定量 PCR 试剂 A 由国内某主流的 PCR 试剂厂家提供,最低检测限为 5.00×10^2 IU/mL,线性范围为 $5.00\times10^2\sim1.00\times10^8$ IU/mL,试剂批号 20120611,采用传统的"煮沸法"提取核酸;试剂 B 由湖南圣湘生物科技有限公司提供,批号 2012008,内标批号为 20120705,最低检测限为 1.00E+02 IU/mL,线性范围为 $1.00\times10^2\sim1.00\times10^9$ IU/mL,B 试剂采用一种新的免核酸提取方法(简称"一步法")。荧光定量 PCR 仪由美国 Applied Biosystem 公司生产的 7300 荧光定量分析仪。乙型肝炎病毒免疫学标志物(HBV-M)检测试剂由厦门英科新创有限公司提供,采用 ELISA 法,ST-360 酶标仪,K30C 型干式恒温器,TGL-16A 低温高速冷冻离心机由湖南凯达有限公司提供,中科美菱 DW-HL668 超低温冷冻储存箱。

1.3 方法 试剂 A 采用传统的"煮沸法",操作如下:加入样品处理液 A 和待测样本、工作标准品、阴性对照、质控品各 100 μL 于 0.5 mL 离心管中,振荡摇匀,置于低温高速冷冻离心机中 17 800×g 离心 10 min,吸弃上清液;再加入 25 μL 的样本处理液 B,振荡摇匀,1 680×g 离心数秒,100 ℃干浴 10 min;之后于冷冻离心机中 17 800×g 离心 10 min,弃上清液 2 μL 点样至 PCR-mix 28 μL PCR 反应管中,上 PCR 仪进行扩增。