

• 论 著 •

应用 EP7-A2 文件探讨溶血对重氮法测定总胆红素的干扰情况*

管华玲¹, 吴 健¹, 王 源², 张汉东^{3△}

(1. 盐城市第一人民医院检验科, 江苏盐城 224005; 2. 浙江省中医院检验科, 浙江杭州 310006;

3. 盐城市第三人民医院检验科, 江苏盐城 224001)

摘 要:目的 应用 EP7-A2 文件评价溶血对临床总胆红素测定的干扰。方法 依据 EP7-A2 文件要求的“配对-差异”实验对干扰物进行确认, 并使用“剂量-效应”实验来分析干扰物浓度与干扰程度之间的关系。结果 “配对-差异”实验结果显示 5 g/L 血红蛋白对 A、B 两种总胆红素试剂均有负干扰, 但 A 试剂盒明显受溶血干扰程度小; “剂量-效应”实验结果显示血红蛋白对总胆红素检测 A 试剂盒可产生线性负干扰, 低值标本的线性方程为 $Y = -0.146X + 14.1$, $r = 0.964$, 中值标本的线性方程为 $Y = -0.546X + 92.24$, $r = 0.947$, 高值标本的线性方程为 $Y = -1.153X + 307.2$, $r = 0.979$ 。结论 溶血对临床总胆红素测定的有线性负干扰, 可以利用标本的血红蛋白浓度对总胆红素的值进行校正; EP7-A2 文件在分析干扰评价方面具有一定的应用价值。

关键词:总胆红素; 重氮法; EP7-A2 文件; 干扰实验

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.24.007

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)24-3525-03

Application of EP7-A2 document for investigating interference of hemolysis on total bilirubin detection by diazonium method*

Guan Linghua¹, Wu Jian¹, Wang Yuan², Zhang Handong^{3△}

(1. Department of Clinical Laboratory, Yancheng Municipal First People's Hospital, Yancheng, Jiangsu 224005, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Jiangsu Provincial Hospital of Chinese Medicine, Hangzhou, Jiangsu 310006, China; 3. Department of Clinical Laboratory, Yancheng Municipal Third People's Hospital, Yancheng, Jiangsu 224001, China)

Abstract: Objective To apply EP7-A2 document for evaluating the interference of hemolysis the total bilirubin detection in clinic. **Methods** The interferent was affirmed according to the "paired-difference" test required by the EP7-A2 document. The relation between interferent concentration and interference degree was analyzed by using the "dose-effect" test. **Results** The "paired-difference" test results showed that 5.00 g/L hemoglobin had negative interference effect on two kinds of total bilirubin reagents. But the reagent kit A had little interference degree of hemolysis; The dose-effect test results showed that hemoglobin produced the linear negative interference effect on the reagent kit A of total bilirubin detection. The linear equation of low value sample was $Y = -0.146X + 14.1$, $r = 0.964$, which of middle value sample was $Y = -0.546X + 92.24$, $r = 0.947$ and which of high value sample was $Y = -1.153X + 307.2$, $r = 0.979$. **Conclusion** Hemolysis has a negative interference effect on total bilirubin detection in clinic. The total bilirubin value could be corrected by using the hemoglobin concentration of sample; the EP7-A2 document has certain application value in the aspect of analyzing interference and evaluation.

Key words: total bilirubin; diazonium method; EP7-A2 document; interference test

人体内的胆红素大部分来自衰老红细胞裂解释放出的血红蛋白代谢, 其对神经系统功能具有严重的影响和干扰作用。肝脏是人体重要的代谢器官, 对包括胆红素在内的代谢产物具有强大的处理能力。因此, 在临床中, 血清中胆红素浓度的高低是诊断肝病的重要指标。目前, 全自动生化分析仪在绝大多数医院得到了使用, 其检测胆红素的主要方法是重氮试剂法, 通过仪器自动比色测定, 因此, 血标本的溶血、脂浊、黄疸等情况对检测结果具有很大的影响^[1]。本研究拟依据美国临床实验室标准化委员会(CLSI)制定的评价方案 EP7-A2 文件^[2-3], 分析和评价溶血对重氮法试剂测定血清总胆红素的干扰情况。

1 材料与与方法

1.1 材料 溶血干扰物(血红蛋白储存液)的制备严格按照 EP7-A2 标准程序, 采集 5 mL 肝素抗凝血; 离心 10 min 制备压积红细胞; 弃掉血浆, 加入 10 mL 等渗盐水; 轻轻颠倒试管 10

次, 离心 10 min, 弃掉盐水洗涤液, 重复用等渗盐水洗涤 2 次; 用等体积的蒸馏水稀释细胞, 颠倒试管 10 次充分混匀, 冰冻过夜; 解冻细胞, 使其恢复至室温; 离心 30 min, 除去细胞基质, 保留上清液(血红蛋白溶血液), 除掉红细胞碎片; 测定溶血液的血红蛋白浓度为 125 g/L。

1.2 仪器与试剂 (1)仪器。检测采用雅培公司生产的 Architect ci8200 全自动生化免疫分析仪, 其生化部分的胆红素检测方法为重氮试剂法, 通过仪器自动比色测定。(2)试剂。总胆红素测定(重氮盐法)试剂盒(A 试剂批号为 41174UQ04; B 试剂批号为 93035HW00), 校准品为雅培公司提供的生化多项校准品, 室内质控品为美国 Bio-Rad 公司生产的液体多项质控(水平 2、3)。

1.3 方法

1.3.1 总胆红素测定的主要参数 A、B 试剂盒测定的方法

* 基金项目:浙江省医药卫生科技计划资助项目(2015YB262)。

作者简介:管华玲,女,副主任技师,主要从事临床检验基础的研究。△

通讯作者, E-mail: piaoxue1982717@sina.com。

均为一点终点法,测光点分别为 20~22 和 31~33,主/副波长均为 548 nm/604 nm。两个试剂盒使用的标本、R1 试剂量、R2 试剂量分别为,A 试剂盒:2.6、160、40 μL,B 试剂盒:5、160、40 μL。

1.3.2 基础标本的制备 选取无溶血、无黄疸、无脂浊的本院健康体检者的新鲜混合血清作为低值标本;采用无溶血、无脂浊的胆红素中度升高的患者混合血清作为中值标本;采用无溶血、无脂浊的胆红素重度升高患者混合血清为高值标本。

1.3.3 对照标本和干扰标本的制备 溶血干扰标本为 1 920 μL 基础标本加入 80 μL 血红蛋白储存液,其血红蛋白浓度为 5 g/L;对照标本为 1 920 μL 基础标本加入 80 μL 生理盐水。

1.3.4 “剂量-效应”标本的配制及分析 依据 EP7-A2 文件的要求,制备 5 个浓度的干扰测试标本,来确定 1 个线性的剂量效应关系。0 浓度标本和 1 浓度标本按 1.3.3 要求制备的对照标本和干扰标本,并以此为基础按不同比例配成 5 种测试混合液,见表 1。在同一分析批之内检测 5 种测试混合液,第 1 组按照升序测定各标本,第 2 组按降序测定,第 3 组按照升序,以降低系统漂移对检测的影响。

1.3.5 “配对-差异”分析 (1)临床可允许的最大干扰范围的确定:按照美国 CLIA'88 的规定,总胆红素的 CLIA 室间差异评估指标为 6 μmol/L 或 20%,以此确定最大干扰范围($d_{\max}$)。(2)计算实验需要的重复测定次数:首先计算临床可允许的

$d_{\max}$ 与批内标准差(s)比值,然后根据 EP7-A2 文件中的表格,可得出总胆红素 3 个浓度水平重复测定次数。 s 通常由基础标本重复测定 10 次后计算可得。(3)干扰结果的判断:根据 EP7-A2 文件计算 d_{obs} , $d_{\text{obs}} = \overline{X}_{\text{test}} - \overline{X}_{\text{control}}$ 再计算 $d_{\text{obs}} \pm 1.96 \sqrt{2_s^2/n}$ (s 为总胆红素测定的标准差, n 为测定的次数)的数值,如果其范围不包括 0,则可判断溶血对总胆红素有干扰^[4]。

表 1 “剂量-效应”标本的配制

测试混合液	标本体积(μL,0 浓度+1 浓度)	血红蛋白终浓度(g/L)
1 号	0+600	0.00
2 号	150+450	1.25
3 号	300+300	2.50
4 号	450+150	3.75
5 号	600+0	5.00

2 结 果

2.1 溶血对总胆红素的干扰 对测得的干扰标本和对照标本的结果进行数据分析,并根据 1.2.6 中的公式进行干扰判断,可见血红蛋白浓度为 5 g/L 时,溶血对 A、B 试剂盒的检测均有负性干扰,但 A 试剂盒抗干扰能力明显优于 B 试剂盒。见表 2。

表 2 干扰标本和对照标本的测定结果与干扰判断

试剂类型	基础标本类型	干扰标本均值(μmol/L)	对照标本均值(μmol/L)	d_{obs}	$1.96 \sqrt{2_s^2/n}$	干扰判断
A 试剂	低值	13.17	14.13	-0.97	0.11	负干扰
	中值	89.90	92.70	-2.80	0.37	负干扰
	高值	301.20	307.90	-6.70	1.16	负干扰
B 试剂	低值	<1.80	16.63	<-14.83	0.05	负干扰
	中值	<1.80	101.53	<-99.73	0.67	负干扰
	高值	189.80	331.40	-141.67	1.31	负干扰

2.2 溶血对总胆红素检测干扰的“剂量-效应”分析 对 A 试剂盒进行剂量效应分析,不同浓度的血红蛋白对总胆红素测定产生的负干扰呈线性,低值标本的线性方程为 $Y = -0.146X + 14.1$, $r = 0.964$;中值标本的线性方程为 $Y = -0.546X + 92.24$, $r = 0.947$;高值标本的线性方程为 $Y = -1.153X + 307.2$, $r = 0.979$ 。干扰效应结果见表 3,“剂量-效应”回归分析图分别见图 1~3(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

表 3 溶血对总胆红素检测的干扰剂量效应结果

序号	血红蛋白浓度(g/L)	低值标本(μmol/L)	中值标本(μmol/L)	高值标本(μmol/L)
1	0.00	14.2	92.7	307.7
2	1.25	13.8	91.1	305.3
3	2.50	13.7	90.6	304.5
4	3.75	13.6	90.3	303.6
5	5.00	13.4	89.7	301.0

3 讨 论

在临床工作中,血清总胆红素测定是了解人体肝脏功能的

重要指标之一,特别是当胆红素浓度显著升高时,常常反映人体肝脏有严重的细胞损伤;另外,在区分新生儿生理性、病理性黄疸时,血清总胆红素亦是主要指标之一。有研究者认为,在使用重氮法检测胆红素时,标本轻度溶血对检测结果没有明显的干扰,但当标本严重溶血时可使测定值低于实际值,其原因可能是血红蛋白与重氮试剂反应形成的产物可破坏偶氮胆红素,还可被亚硝酸氧化为高铁血红蛋白而干扰吸光度测定^[5-6]。溶血是常见的影响检测结果的分析前原因,新生儿采血比较困难,更易导致标本溶血,因此评价血红蛋白对总胆红素的分析干扰是有重要临床意义的。EP7-A2 文件是干扰评价的标准方法,该文件对临床实验室中各种检测方法、仪器以及各种类型标本都有较好的适用,可用于分析临床多种可疑干扰物。依据 EP7-A2 文件,可先利用“配对-差异”方法来确认疑似干扰物是否对该检测项目的测定产生干扰,如果发现有干扰,则可以利用“剂量-效应”方法进一步评价干扰物浓度与干扰程度之间的相互关系^[7-8]。

在临床工作中,患者血清中胆红素的浓度随病情变化差异较大,同样的溶血情况对不同浓度的胆红素测定影响程度也不一样,所以本实验依据血清中胆红素浓度设(下转第 3529 页)

器械、导管等的消毒和管理,同时加强医务人员手的消毒和清洁,以减少医院感染的机会。

连续三年的血培养结果显示,MRSA 检出率呈下降趋势,合计检出率为 18.8%。由于 MRSA 的不均一耐药性,给其检测带来了一定的困难^[12]。本研究中是否由于新的变异株不断出现,使得检出率下降有待进一步研究探讨。多重耐药鲍曼不动杆菌(MDRAB)检出率合计为 42.9%,呈上升趋势,与近年文献报道一致^[13]。鲍曼不动杆菌对临床常用抗菌药物的耐药性较严重,这可能与其复杂的耐药机制有关^[14],对于鲍曼不动杆菌引起的血流感染应根据药敏试验结果谨慎选用抗菌药物。产 ESBLS 的大肠埃希菌与肺炎克雷伯菌 3 年内明显升高,由于产酶菌株的出现将增加临床治疗中的困难,因此,在临床治疗中,临床医生应对细菌耐药性引起高度重视,且必须根据药敏结果合理、有效地选用抗菌药物^[15]。

耐药菌株出现和传播,使临床治疗面临极大挑战。临床医生应严格掌握抗菌药物用药指征,规范诊疗操作,以预防和控制血流感染感染。

参考文献

[1] Bourneton O, Mutel T, Heranney D, et al. Incidence of hospital-acquired and community-acquired bloodstream infections in the university of Strasbourg Hospital, France, between 2005 and 2007 [J]. *Pathol Biol(Paris)*, 2010, 58(1): 29-34.

[2] Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008 [J]. *Intensive Care Med*, 2008, 34(1): 17-60.

[3] 郑姬, 张晓兵, 董彦芳, 等. 2006-2008 年血培养主要病原菌的分布与耐药性变迁 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2009, 19(14): 1868-1871.

(上接第 3526 页)

定了高、中、低值 3 个组。本实验应用 EP7-A2 文件建议的血红蛋白储存液对 A、B 两种总胆红素检测试剂盒在 3 个胆红素浓度水平进行可“配对-差异”分析,可知血红蛋白液对两种试剂均具有负干扰,但由实验数据可知 A 明显较 B 试剂盒受溶血干扰程度小,更具临床应用价值。本实验对总胆红素检测 A 试剂盒进行了“剂量-效应”分析,可知在低、中、高 3 个胆红素浓度,总胆红素的测定值与血红蛋白浓度间具有良好的相关性,因此,对于一些严重溶血的标本,总胆红素的检测值应为假性降低,可以以本实验得出的线性方程,计算出总胆红素的真实值。

当然,EP7-A2 文件也有其自身的局限性。在临床工作中,干扰常常来自于多种干扰物,而目前仍没有一种有效的试验方法可以同时鉴别所有的干扰物^[9]。另外,一方面溶血的干扰可以降低总胆红素检测的数值,另一方面当严重溶血产生的未结合胆红素可以导致标本中总胆红素浓度增高,而最终总胆红素的测定结果是否会偏高,有待进一步的研究。所以医务人员应充分了解造成溶血的原因,在采集、处理标本的过程中,尽量避免溶血,为临床提供准确的诊断依据。

另外,在临床生物化学分析中,可以根据 EP7-A2 文件,利用已经上市使用的试剂盒,应用医学统计软件,对其他检测项目进行干扰评价,这样可以给临床和患者提供更加可靠的检验结果。

参考文献

[1] 许晓文. 溶血对血清总胆红素测定方法的影响 [J]. *吉林师范大学*

[4] Clinical and Laboratory Standards Institute. M100-S21 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing [S]. Wayne, PA, USA: CLIS, 2011.

[5] 中华人民共和国卫生部. 医院感染诊断标准(试行) [J]. *中华医学杂志*, 2001, 81(5): 314-320.

[6] 陈潇, 徐修礼, 樊新, 等. 10941 份血培养标本中病原菌群分布及耐药性分析 [J]. *中国感染控制杂志*, 2010, 9(4): 264-266.

[7] 孔繁林, 储从家, 管新龙, 等. 28292 份临床血液标本细菌培养结果 [J]. *中国感染控制杂志*, 2011, 10(3): 209-213.

[8] 褚云卓, 年华, 邓宇欣, 等. 血培养的菌谱调查及耐药性分析 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2007, 17(4): 472-474.

[9] 王佩芳, 凌春华, 陈延斌, 等. 大肠埃希菌及肺炎克雷伯杆菌血流感染分布及药敏分析 [J]. *江苏医药*, 2012, 38(4): 436-437.

[10] 张风华, 王大利. 血培养阳性标本病原菌分布及耐药性分析 [J]. *中国感染控制杂志*, 2008, 7(6): 412-415.

[11] 魏泽庆, 沈萍, 陈云波, 等. Mohnarin2011 年度报告: 血流感染细菌构成及耐药性 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2012, 22(24): 5497-5502.

[12] 吴绍莲, 胡辛兰, 池春燕. 血培养常见病原菌的变迁和耐药性分析 [J]. *实验与检验医学*, 2013, 31(2): 138-140.

[13] 焦江琴, 李捷, 陈双双. 395 株鲍曼不动杆菌在临床分布及药敏分析 [J]. *实验与检验医学*, 2013, 31(3): 284-285.

[14] De Francesco MA, Ravizzola G, Peroni L, et al. Prevalence of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* in an Italian hospital [J]. *J Infect Public Health*, 2013, 6(3): 179-185.

[15] 党好, 张任飞, 潘淑, 等. 2012 年肺炎克雷伯菌的临床分布及耐药性分析 [J]. *实验与检验医学*, 2013, 31(3): 248-250.

(收稿日期: 2015-08-11)

学报: 自然科学版, 2004(2): 107-111.

[2] Clinical and Laboratory Standards Institute. EP7-A Interference testing in clinical chemistry [S]. Wayne, PA, USA: CLSI, 2002.

[3] Clinical and Laboratory Standards Institute. EP7-A2 Interference Testing in Clinical Chemistry, Approved Guideline-Second Edition [R]. Wayne, PA, USA: CLSI, 2005.

[4] 姚少羽, 刘一鸣, 喻雄文, 等. 应用 EP7-A2 文件评价脂浊对淀粉酶的干扰及其定量化 [J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2008, 29(4S): 109-111.

[5] 朱忠勇. 实用医学检验学 [M]. 北京: 人民军医出版社, 1997. 408-415.

[6] 安崇文, 曹晨影, 焦莉莉, 等. 4 种总胆红素检测系统的性能评价 [J]. *临床检验杂志*, 2014, 32(3): 230-235.

[7] Bossuyt x, Blanckaert N. Evaluation of interference in rate and fixed-time nephelometric assays of specific serum proteins [J]. *Clin Chem.*, 1999, 45(1): 62-67.

[8] 孙虹, 牛华, 赵崇吉, 等. 胆红素、血红蛋白和乳糜微粒对生化检测结果的干扰评价 [J]. *国际检验医学杂志*, 2011, 32(21): 2509-2512.

[9] 徐建华, 何敏, 柯培锋, 等. CLSI EP7-A2 文件在临床化学分析干扰试验中的应用评价 [J]. *检验医学*, 2010, 25(12): 971-974.

(收稿日期: 2015-05-08)

