

血清样品前处理对全自动酶免分析仪常见故障及检测结果信度的影响

王琳(江苏省如皋市人民医院 226500)

【摘要】 目的 探索一种安全规范、便捷可靠且易于推广的血清标本前处理方法。方法 选取 2013 年 4~6 月如皋市人民医院健康体检者共计 1 980 份血液标本,以乙型肝炎病毒标志物为例,采取 3 种血清标本前处理方法干预后行全自动酶免分析仪测定,比较不同方法之间的仪器故障率及测定结果之间的可信性等。结果 (1)仪器故障率:方法①(常规处理方式)处理后全自动酶免分析仪检测过程中堵针率和吐板率均高于方法②(仪器建议标准处理方式),以方法③(改良处理方式)处理标本后,上述常见故障率与方法②比较差异无统计学意义($P>0.05$)。(2)上机测得各项目 S/COV 值(即标本 A/cut off 值):方法①与方法②各检测指标测定结果比较,抗-Hbe 无差异,HBsAg、抗-HBs、抗-HBc、HBeAg 测定结果均存在差别;方法③与方法②比较,全部检测指标测定结果均无差异。(3)可疑结果电化学法验证:检测结果假阳性及假阴性率方面,对于 HBsAg,常法①上述指标发生率分别为 2.35%、0.58%,而标准法②及改良法③均未出现假阳性、假阴性结果;对于抗-HBs,常法①假阳性率和假阴性率分别是 3.01%、1.22%;标准法②及改良法③均未出现假阳性、假阴性结果;可疑 HBsAg、抗-HBs 结果经 χ^2 检验,方法①上述 2 项指标全自动酶免分析仪检测结果与电化学法比较差异均有统计学意义($P<0.05$),方法②、③测定结果差异则无统计学意义($P>0.05$)。结论 改良之方法③是一种既便捷省时,又安全可靠的理想方法。

【关键词】 血清标本; 前处理; 全自动酶免分析仪

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2014.13.041 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2014)13-1836-03

随着科技发展日新月异,全自动酶免分析仪检测已逐渐取代传统手工酶免操作试验,成为当今酶学指标检测的主导途径。在实际工作中,作者发现其虽削弱了主观因素在检测中可能带来的偏倚和误差,但不同的标本前处理方法对全自动酶免分析仪检测结果仍具有不可忽视的影响。本研究于近期检验工作以临床常见检测指标乙型肝炎病毒标志物为例,采取 3 种血清标本前处理方法干预样品后,采用全自动酶免分析仪测定,比较不同方法之间的仪器故障率及测定结果之间的准确性和稳定性等。以期探索一种安全规范、便捷可靠且易于推广的血清标本前处理方法,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 受试对象 选取 2013 年 4~6 月本院健康体检者共计 1 980 份血液标本为研究样品。体检者均空腹采集肘静脉血 2 mL(使用不抗凝真空管)进行乙型肝炎病毒标志物即测定(HBsAg、抗-HBs、HBeAg、抗-HBe、抗-HBc)。

1.2 试剂与仪器 酶免分析仪试剂:上海科华生物工程公司生产。电化学发光试剂购自 Roche 公司。全自动酶免分析仪:Halmiton 公司生产(瑞氏,STAR FAME 型),生产电化学发光仪:Roche 公司(德国,E-170 型)。

1.3 研究方法

1.3.1 血清受试样品前处理 血液样品预先于室温环境中静置 30 min 后随机应用下列 3 种方法进行预处理,最后以全自动酶免分析仪进行选取指标的测定:方法①即常规处理方式,离心采用 3 000 r/min 操作 10 min,除去上盖,弃肉眼可见的纤维蛋白之后上机检测;方法②即仪器建议标准处理方式,离心采用 3 000 r/min 离心 10 min,除去上盖,经移液枪分离血清于干燥试管中上机检测;方法③即改良处理方式,采用 3 000 r/min 离心 5 min 后,使试管轻柔且完全颠倒 2 次,3 000 r/min

离心 4 min,最后上机检测。

1.3.2 研究内容 (1)3 种血清样品处理方法引致常见仪器故障发生率差异比较:堵针率(吸样时发生堵针次数/吸样总次数)、吐板率(仪器检测过程中吐板数量/所测定全部微板数量)等;(2)S/COV 值(即标本 A 值/cut off 值)比较:收集 150 份静脉血标本,每人 3 份无抗凝标本,同时以上述 3 种标本处理方法进行前处理,之后于全自动酶免分析仪上进行测定,对照 3 种处理方法后各项指标的 S/COV 值;(3)可疑结果复查:对酶免仪测定结果不一致及 S/COV 值介于 0.90~1.10 者,采用电化学发光法对血清样本进行复查与确认。

1.4 统计学方法 检测结果采用 SPSS 17.0 软件包实施数据分析,以配对 t 检验进行均数比较, χ^2 检验完成分类计数资料分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 全自动酶免分析仪常见故障发生率比较 各种前处理方法干预标本后全自动酶免分析仪常见运行故障发生情况见表 1。方法①处理后全自动酶免分析仪检测过程中堵针率和吐板率均高于方法②,差异有统计学意义($P<0.01$);方法③与方法②故障率比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.2 测定指标 S/COV 值比较 待检 150 份血液标本分别以上述 3 种样品前处理方法干预后,全自动酶免分析仪测定各指标 S/COV 值见表 2。方法①与方法②各检测指标测定结果比较,HBeAg 差异无统计学意义($P>0.05$),其余 4 项差异均有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$);方法②与方法③比较,全部检测指标测定结果差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.3 可疑测定结果电化学法复查确认 见表 3。对 3 种不同前处理后酶免分析仪测定结果不一致的标本及 S/COV 值介于 0.90~1.10 者,采用电化学发光法对血清样本进行复查测

定。对于 HBsAg, 常法①上述指标发生率分别为 2.35%、0.58%, 而标准法②及改良法③均未出现假阳性、假阴性结果; 对于抗-HBs, 常法①假阳性率和假阴性率分别是 3.01%、1.22%; 标准法②及改良法③均未出现假阳性、假阴性结果; 可

疑 HBsAg、抗-HBs 结果经 χ^2 检验, 方法①上述 2 项指标全自动酶免分析仪检测结果与电化学法比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 方法②、③测定结果差异则无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 3 种前处理方法致仪器常见故障率对比

前处理方法	标本数	检测总次数	堵针次数	堵针率 (%)	检测微板总数	吐板次数	吐板率 (%)
①	850	4 250	259	6.10*	112	18	16.07
②	80	400	0	0.00	9	0	0
③	900	4 500	3	0.06	125	0	0

注:与方法②比较,* $P < 0.05$ 。

表 2 3 种前处理方法 S/COV 值比较 ($n=150, \bar{x} \pm s$)

前处理方法	HBsAg	抗-HBs	HBeAg	抗-HBe	抗-Hbc
①	0.361±0.087**	1.753±0.059*	0.170±0.025	1.663±0.261**	1.591±0.023**
②	0.305±0.074	1.699±0.042	0.168±0.030	1.929±0.198	1.822±0.036
③	0.288±0.053 Δ	1.687±0.050 Δ	0.169±0.020 Δ	1.911±0.206 Δ	1.813±0.020 Δ

注:与方法②比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$, $\Delta P > 0.05$ 。

表 3 3 种前处理方法可疑定性结果与电化学发光法结果对比 (n)

电化学	HBsAg($n=13$)						抗-HBs($n=24$)					
	方法①		方法②		方法③		方法①		方法②		方法③	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
+	2	1	2	0	2	0	12	1	13	0	12	1
-	3	7	0	11	0	11	3	7	0	12	1	11
合计	5	8	2	11	2	11	15	8	13	12	13	12

注: + 表示阳性, - 表示阴性。

3 讨 论

酶联免疫吸附试验 (ELISA) 是当今现代医学临床检验中较为基本而常用的方法之一, 已成为传染病血清学标志物、肿瘤标志物及内分泌等各种临床免疫指标检测的主导技术。全自动酶免分析仪检测方法具有标准化、高效率、高质量的自动化特征, 可很大程度提高工作效率, 节约大批量、多批次样品的检测时间, 并减少人为误差导致的漏检、错判, 但样品上机检测前处理方法的得当与否将直接影响后期测定结果的可靠性。此外, 恰当的标本前处理方法作为酶免自动化测定的前质量控制环节, 是后期测定结果是否可信的重要保证, 也是仪器正常运行的基本前提^[1-2]。正是基于以上现状, 本研究作者结合自身实际临床工作经历, 选取 ELISA 常用的血清样本为探索对象^[3], 从仪器故障率、测定结果之间的准确性和稳定性等方面切入, 借以探究其中安全便捷而可推广度高的血清标本前处理方法, 借以探究其中安全便捷而且利于推广的前处理方法。

3.1 常用方法及仪器建议标准方法优劣分析 方法①是目前多数临床检验机构实施的常规酶免血清样品前处理方法。如本次试验研究结果显示, 其引发之仪器故障发生概率明显高于建议标准操作; 另一方面, 方法结果可信分析所选取的 5 个项目中 4 项 S/COV 值与标准法比较均存在差异^[4]; 对 3 种不同前处理方法结果进行可疑结果验证时, 其假阳性和假阴性结果

发生率均较高。言及可能相关因素, 作者认为方法①虽然除去肉眼可见纤维蛋白成分, 但仍有肉眼不易发现或不可见之成分被吸入仪器的可能, 如分离胶析出或吸到分离胶以及血清分离不彻底, 导致针头堵塞, 继而发生吐板等严重后果, 继而导致测定结果可信度降低^[5]。

方法②是全自动酶免分析仪操作手册建议标准方法, 但该方法费时繁杂, 明显降低全自动酶免分析仪的整体运行效率, 不利于大范围推广; 另外在用移液枪分离和转移血清过程中仍有增加生物安全风险或人为偏倚的可能^[6]。

3.2 改良方法特点分析 方法③为方法①的改良方法, 总时耗较标准法有所减少, 样品经过 2 次离心, 分离充分, 且中途无去盖操作, 大大减少了生物安全风险, 方法简便, 便于标准化和规范化, 质量控制可操作性强。本研究数据分析结果提示, 血液标本经改良方法③处理后, 全自动酶免分析仪堵针率及吐板率明显低于常用方法①, 且与标准法②比较无差别; 与标准法比较, 方法③ 5 项检测指标的 S/COV 值全部无差异; 可疑结果复查, HBsAg 结果一致, 抗-HBs 假阳性和假阴性发生率差异无统计学意义 ($P > 0.05$)^[7]。作者认为, 改良法③与常用方法①相比操作科学性可能在于第一次离心后黏附于管壁的纤维会在完全颠倒过程中剥离管壁, 而二次离心更能利于血块和纤维蛋白之沉积^[8]。结果证明, 改良法血清分离较完全, 可充分

保证后期测定结果的可信性,且利于延长酶免分析仪正常运行。

3.3 血清分离胶的应用展望 如今医学检验技术已全面步入自动化、微机管理的新时代,不论在临床化学、血清学、免疫学等各种检测领域常常都需要分离血清。因此,如何足量且快速分离血清、简化操作,就成为医学检验界迫切需要解决的问题。近年来,血清分离胶的应用使这一问题的解决成为可能^[9-10]。血清分离胶是一种具有触变性的特殊流体,常态下其在内部氢键的缔合作用下形成网状结构,离心时网状结构被破坏,变成黏度低的流体;离心力消失后,其又重新形成网状结构。因此,当分离胶与凝固后的血液在同一试管中离心时,分离胶便在血清和血块之间形成胶状的隔离层将血清和血块隔开,从而提高了血清的获取率,且利于在原状态下保存血清,简化检验过程,提高工作效率。此项技术最早在美国诞生,1991 年中国科学院大连化学物理研究所和大连临床检验中心协作,在国内首次研制出国产的血清分离胶,经严格验证,已完全达到分离胶标准要求。但由于血清分离胶技术知晓率仍不高,以及质量较高的带分离胶真空采血管价格较贵,一定程度限制了它的应用。随着各项相关技术的发展,其必将登上检验医学的历史舞台,发挥举足轻重的作用。

综上所述,通过比较临床常见的 3 种全自动酶免分析仪检测标本的前处理方法之仪器安全使用情况、指标测定可信性、稳定性等,可见改良之方法^③是一种既便捷省时,又安全可靠的理想方法,易于规范和标准化操作,值得各级临床血站系统大力推广。若进一步结合血清分离胶的使用,可能对提高检测效率及信度大有裨益,并有助全面提高 ELISA 的检测质量。

参考文献

[1] 刘正敏,姚海云,韩雪莹,等.不同全自动酶免分析系统检

(上接第 1835 页)

测结果的可信性,且利于延长酶免分析仪正常运行。

参考文献

[1] Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al. World health organization classification of tumors pathology and genetics: tumors of haematopoietic and lymphoid tissues[M]. Lyon: Iarc Press, 2001: 171-174.
 [2] 徐光明,邹学森.非霍奇金淋巴瘤骨髓侵犯 208 例的血液学分析[J].实用癌症杂志,2009,24(5):533-534.
 [3] 应晓杨,张永利.骨髓活检在恶性血液病诊断中的意义[J].医学研究杂志,2009,38(1):98-99.
 [4] Pakos EE, Fotopoulos AD, Ioannidis JP. 18F-FDG PET for evaluation of bone marrow infiltration in staging of lymphoma: a meta-analysis[J]. J Nucl Med, 2005, 46(6): 958-963.
 [5] Schasfer NG, Strobel K, Taverna C, et al. Bone involvement in patients with lymphoma: the role of FDG-PET/

测结果的对比研究[J].临床血液学杂志:输血与检验版,2012,9(4):513-514.

[2] 李燕平.重视分析前质量控制 提高检验质量[J].中华检验医学杂志,2005,28(2):219.
 [3] 郭菲,朱燕霞,郭峰,等.血标本制备对全自动酶标检测 HBsAg 结果的影响[J].中国输血杂志,2004,17(2):91-92.
 [4] 徐琼峰. AP22 Speedy 型全自动酶免分析系统性能验证[J].检验医学与临床,2013,10(13):1638-1639.
 [5] 朱阳泉,徐长根,戴瑞娣,等.影响 FAME 全自动酶免分析系统检测因素探讨[J].临床输血与检验,2004,6(4):254-256.
 [6] 黄惠,王丽娜,詹诣. TECAN 全自动酶免分析系统检测乙型肝炎血清学标志物的特异性评价[J].检验医学,2010,3(3):161-163.
 [7] 苏宗义,张振国,李彩虹.全自动酶免分析仪检测 HIV 携带阳性解决方法的探讨[J].中国当代医药,2013,4(4):98-99.
 [8] 彭庆兵.标本因素对酶联免疫吸附试验测定的影响[J].实用医技杂志,2007,14(31):4292-4293.
 [9] 姚维菊.不同血液样本在常规生化项目检测中的结果比较[J].检验医学与临床,2013,10(4):468-469.
 [10] 秦维超,邱方域,严礼华,等.血清分离胶对生化指标测定的临床应用研究[J].江西医学检验,2002,20(6):335-336.

(收稿日期:2013-11-08 修回日期:2014-02-11)

CT[J]. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2007, 34(1): 60-67.

[6] 朱雄增. WHO(2008)恶性淋巴瘤分类解读[J].诊断病理学杂志,2009,16(4):241-245.
 [7] Cheson BD, Pfistner B, Juweid ME, et al. Revised response criteria for malignant lymphoma[J]. Clin Oncol, 2007, 25(5): 579-586.
 [8] 李志阳,王金龙,李菊香.非霍奇金淋巴瘤骨髓侵犯后骨髓象分析[J].实用医学杂志,2009,25(3):428-429.
 [9] 张旭,樊卫,林晓平,等.18F-FDG PET/CT 与双侧髂棘穿刺活检在弥漫大 B 细胞淋巴瘤骨髓浸润中诊断价值[J].肿瘤学杂志,2008,14(8):640-643.
 [10] Chung R, Lai R, Wei P. Concordant but not discordant bone marrow involvement in diffuse large B cell lymphoma predicts a poor clinical outcome Independent of the International Prognostic Index[J]. N Engl J Med, 2007, 329(5):987-994.

(收稿日期:2013-11-06 修回日期:2014-02-10)