

全国临床检验测定方法规范化 学 习 班 讲 义

卫生部临床检验中心临床室

前 言

临床检验近年来发展较快,在全国引进了不少自动化血液、尿液及血凝分析仪,是我国提高临检水平的大好时机。近两年分别在广州丛化、北京市及福建武夷山召开了全国临检专家座谈会,就血液、尿液及血栓与血检测方法的规范化进行了研讨,并提出了具体要求及建议,为了贯彻几次会议的精神,我们举办了此次学习班,希望通过学习班把规范化的操作方法向全国推广。

卫生部临床检测中心临检室

一九九六年一月

目 录

中华医学会检验学会临床血液与尿分析专题研讨会主要精神	丛玉隆	1
我国凝血酶原情况的调查及今后开展室间质评的意见	陈宝梁	4
尿液常规自动化检查应注意质量控制	丛玉隆	13
全国血液学室间质量评价进展	彭明婷	19
血液分析仪的质量评价及标准	陈宝梁	23
血液分析仪的质量控制	彭明婷	39
白细胞粒度分布简介	金大鸣	45
血液分析仪白细胞直方图及细胞分类简介	陈宝梁	49
红细胞容积分布宽度及其直方图在临床上的应用	陈宝梁	61

中华医学会检验学会 临床血液与尿分析专题研讨会主要精神

一. 自动化血细胞分析仪使用中的一些问题

1. 血样:自动化血细胞分析仪(下称血液分析仪)一般均要求用静脉血加抗凝剂;除了婴儿、少数无法取得静脉血的患者、某些血液病或肿瘤化疗需经常采血检验者外,应尽量避免用皮肤穿刺采外周血。

2. 抗凝剂:根据国际血液学标准化委员会(ICSH)1993年文件建议,血细胞计数用EDTA二钾盐作抗凝剂,用量为EDTA-K₂·2H₂O 1.5—2.2mg(4.45±0.85umol)/mL血。

3. 贮血容器及血液贮存:用已含干燥抗凝剂并具有可严密塞紧的,洁净的橡胶或塑料塞子的玻璃或塑料管作采血及贮血容器(国内已生产出封闭式真空采血器),血液在室温中贮存最好不超过6小时;如需制血片时,应在2小时内涂片

4. 稀释:全自动血液分析仪皆由仪器自动稀释;半自动分析仪通常要预稀释。为保证稀释准确,吸血管、自动稀释器要经过校准,并要作定期检查、校准。吸血后吸样管外的血液要擦净。血样稀释后要尽快测定,否则易引起“稀释性溶血”(除非用含溶血抑制物的稀释杯)。

5. 混匀:检测前的混匀极端重要。为保证彻底混匀,一般血液分析仪均配备自动转式)混匀器;如无此器,一定要在吸样前颠倒混匀至少8次。贮血管内不可充满血液,要留一个较大的气泡,以便混匀。

6. 试剂:溶血剂、稀释液及清洗剂等最好用原厂配套产品,以保证质量。但如果国内开发出经过严格的对照,证明与原厂试剂测定结果完全一致(包括正常及异常标本的白细胞分类及三种直方图),并经过专家鉴定和有关部门抽查合格产品,亦可使用。

7. 关于白细胞分类:首先必须明确,迄今为止,世界上无论多先进的血液分析仪,用于白细胞分类都只能当作一种过筛手段,不能完全取代手工镜下分类。因为它不能准确区分幼稚白细胞,异常淋巴细胞和有核红细胞等;三项分类以下的中、低档仪器,多是以加入特殊溶血剂后,各类白细胞体积大小不同作为分类的依据的,还不能准确的区分嗜酸,嗜碱性细胞和单核细胞。因此当出现白细胞,红细胞及血小板明显升高或降低,白细胞分类出现异常结果;红细胞及血小板直方图或散点图出现异常图形,以及仪器上显示任何警示信号(flag)时,(各型仪器的显示的符号与内容略有不同),均应用显微镜复检染色的血片或镜下白细胞分类。要坚决反对当前有些单位用了自动血液分析仪后,就一律不再作镜下复检和分类的错误倾向,最好每份标本都先涂一张血片,以备必要时作镜下复检。

二. 血栓与止血检验问题

1. 凝血时间测定 玻片法及毛细管法应予淘汰。有关内源凝血系统的过筛检查,积极推荐采用简便、实用、敏感的活化部份凝血活酶时间(APTT)测定。

2. 出血时间测定 逐步淘汰目前广泛采用的Duke氏法,积极推荐采用“出血时间测定器”法检测。

3. 凝血酶原时间(PT)测定 必须强调:(1)所用的组织凝血活酶试剂必须标有国际敏感性指数(ISI);此数值愈低,表示试剂愈敏感。(2)如用手工操作,必须采用WHO推荐的倾斜试管法,不用平皿挑丝法。(3)每次测定必须有参比血浆作对照;自制正常参比血浆应选择18—25岁健康人至

少20例,男女各半。女性不在行经和妊娠期,不可服用任何药物。空腹,平静休息1—2小时后采血。制备的混合血浆分装后-80℃保存,可用半年到一年。(4)报告方式:以秒数报告,同时必须注明正常参比血浆的秒数;或以PT的比值(PTR)报告。为了与国际上目前通行的报告方式接轨,特别是便于临床口服抗凝治疗的监测,还应报告国际标准化比值(INR)。淘汰以活动度报告的方式。(5)建议国内有条件的单位生产符合规定的,标有ISI值的组织凝血活酶试剂,争取附有正常和异常参比血浆,同时发布加强试剂的质量监控。

4. 纤维蛋白原测定 目前各地采用的方法很不统一,结果差异较大,应逐步统一。建议采用凝血酶法测定。

5. 关于血栓与止血检验中各种方法的标准化问题,建议医学检验学会临床检验学组与血液学会的血栓与止血学组加强交流和沟通,共同协商并拟订实施方案向全国推荐。

三. 尿常规检验的一些问题

1. 尿常规检查:化学检验及尿沉渣显微镜检查等内容。

2. 外观检查:至少应包括颜色和浊度两项,必要时还应报告尿的气味。

颜色:正常尿液应为灰黄至琥珀色,为了使报告术语标准化,可将病理性尿色围绕红色、黄色、绿色和棕色四种报告。

浊度:正常尿混匀后应为透明。为了使报告术语化,可将尿液浊度分为透明、雾状、云雾状、浑浊四种报告。

3. 化学检查:普通化学检查至少应包括糖和蛋白两项。尿糖用葡萄糖氧化酶法;在条件较差的基层单位也可用班氏法。尿蛋白用磺基水杨酸法或加热醋酸法。

干化学方法至少应检查糖和蛋白两项。在用“尿8项”或“尿10项”尿液分析仪时,应注意下列几个问题:

(1)标本必须新鲜,最好在取样2小时内完成。

应注意干化学法与湿化学法之间有时存在一定差异。例如,干化学法蛋白试纸条只能检测白蛋白,而磺基水杨酸法则白、球蛋白均可检测。尿糖试纸条只测葡萄糖,而班氏法测的是还原性物质(包括还原糖)。

(3)要注意药物对试验的干扰,特别是维生素C。

(4)干化学法检测红、白细胞仅可作为一项过筛试验,且迄今还没有检测管型的干化学方法。因此,目前有些单位用了干化学尿液分析仪后,就一律不作尿沉渣镜检的做法是错误的。只有符合下列全部四条要求,才可不作镜检:

- ① 尿白细胞结果为阴性。
- ② 红细胞结果 $<10/uI$ 。
- ③ 尿蛋白为阴性。
- ④ 亚硝酸盐为阴性。

对于泌尿系统疾病患者,即使符合上述四条,也应进行显微镜检查。

4. 尿沉渣显微检查:严格控制实验条件,包括离心用的标本时,相对离心力及离心时间,剩余尿沉渣量,加于玻片上的尿量(面积及高度),盖玻片的面积及重量等。为了使沉渣镜检测标准化,建议逐步使用一次性专用的尿沉渣定量检测板(国内已有销售)。同时建议逐步采用每微升多少细胞的报告方式。

5. 其他应注意的几个问题:

(1) 尿标本的收集与保存极为重要。容器要清洁(最好为一次性),标本务必新鲜,及时送检,否则要加合适的防腐剂。

(2) 要严格执行质量控制的各项步骤。选购合适的质控物;对试条及仪器进行例行的质量监

控。同时注意分析后的质控,分析实验结果是否符合临床,检验报告单位填写是否正确,规范。

(3) 送验者要认真填写申请单。理想的尿液检验申请单应包括:病人姓名、性别、年龄、科别、床号、检验号、标本类型(晨尿、任意尿、餐后尿、24 小时尿);临床诊断、应用的药物、收集标本的时间、实验室收到时间等。

我国凝血酶原情况的调查及今后开展室间质评的意见

卫生部临床检验中心

陈宝梁

凝血酶原时间测定是一种外源性凝血系统的过筛试验,其正常与否主要取决于因子 V、VII、X、凝血酶原以及纤维蛋白原在血浆中的水平。PT 的延长多见于先天性因子 V、VII、X、凝血酶原缺乏症,获得性缺乏多见于肝病,阻塞性黄疸,DIC 及口服抗凝药物治疗时,是当前监测口服抗凝治疗的主要实验室指标。

由于诊断、治疗尤其抗凝治疗监测对 PT 实验的广泛应用,对 PT 测定的试剂、方法学的标准化对开展室内质控及室间质控工作有了很高的要求。这些工作在国外开展较早,如美国病理学院,1963 年即进行了 PT 的室间质评活动,1967 年美国通过了改进临床实验室方案以后,CDC 开展了全国性的 PT 室间质评活动,1972 年有 380 个实验室参加 CDC 活动,于此同时已有 7000 个实验室参加了 CAP 组织的活动。

CAP 的 PT 室间质评结果(12—14 秒)

评价年份	手工操作(CV)	自动仪器测定(CV)
1968	10.7	—
1969	11.0	7.3
1970	6.7	5.9
1971	7.6	5.7
1972	7.6	5.5

CAP 的 PT 室间质评结果(24—28 秒)

评价年份	手工操作(CV)	自动仪器测定(CV)
1968	15.3	—
1969	8.0	7.0
1970	7.1	7.7
1971	8.9	8.2
1972	8.6	7.4

1970 年起德意志联邦共和国开展了全国室间质评工作,每季度一次,开始有 30 个实验室参加,至 1975 年已发展到近 200 个实验室,法国亦从 1970 年开始进行 PT 室间质评活动,每年 3—4 次,参加单位起初都是志愿者,1976 年法国国会制订了一条法规,医学实验室必须参加室间评价活动,故参加单位猛增至 4300 个。PT 变异系数从 1974 年的 23%降至 1978 年的 9%。我国的 PT 测定,全国一直未开展室间质评工作,各省市自治区只有上海市开展了全市的 PT 室间质评工作,鉴于 PT 测定重要性,我们决定开展全国室间质评工作。为了做好准备工作,我们于 94 年进行了两次调查工作,第一次为发函调查,向全国地区级以上的大中型医院发函三百五十份,从回信中可看到以下六点情况:

- 一. 约 30%未开展 PT 试验。
- 二. 大部份 PT 检测数量很少,每月平均小于十份。
- 三. 大部份未做室内质控。
- 四. 只有 16.1%用仪器测定,其余均为手工测定。
- 五. 手工法测定的参考值,短的仅 6 秒,长的达 17 秒。
- 六. 约 1/3 实验室凝血活酶为自己制备,购置的生产厂家有九个。

第二次调查为各实验室测定的结果调查,发给各实验室一支兔脑凝血活酶制剂,一支冻干参比血浆,按统一的要求进行稀释,各实验室同时准备在用的凝血活酶一份,正常人(或混合正常)血浆一份,用各实验室在用的凝血活酶测定正常血浆及参比血浆各二次,再用所发的凝血活酶测定正常血浆 PT 秒数作为 PT 比值。以下列形式回报。

PT 测定结果回报表

测定内容	测定结果(秒)			比值
	第一次	第二次	平均	
你室凝血活酶+正常血浆				
你室凝血活酶+参比血浆				
所发凝血活酶+正常血浆				
所发凝血活酶+参比血浆				

调查回报结果分析

测定内容	n	X	S	CV(%)	最高值	最低值
各室日用凝血活酶+正常血浆	80	13.3	2.01	15.1	18.8	9.25
各室日用凝血活酶+参比血浆	80	14.6	2.83	19.3	25.25	8.4
参比血浆/正常血浆比值	80	1.099	0.157	14.3	1.86	0.8
所发凝血活酶正常血浆	79	15.5	3.06	19.76	25.3	10.0
所发凝血活酶+参比血浆	79	16.51	3.69	22.3	26.1	10.1
参比血浆+正常血浆比值	79	1.06	0.151	14.2	1.66	0.66

从表中看到所得结果的最高值和最低值相差2倍至3倍,比值最高值和最低值亦相差2倍以上。用相同的试剂及参比血浆亦相差2.5倍,说明方法学亟待规范化、标准化。

但从总体看,虽未经过系统培训,但各实验室的变异系数最高的为22.3,与法国开始做室内质评时的23%相似,所以只要认真开展标准化及室内质评工作,在几年内,即可使室间差异大大缩小。

三个参考室结果分析

测定内容	参考实验室		
	1	2	3
本实验室用凝血活酶+正常血浆	12.05	12	11.5
本实验室用凝血活酶+参比血浆	12.2	13.3	11.55
参比血浆/正常血浆比值	1.021	1.11	1.004
所发凝血活酶+正常血浆	17.25	16	11.3
所发凝血活酶+参比血浆	18.85	18.2	11.6
参比血浆正常/血浆比值	1.09	1.41	1.03

从上表可以看到用各实验室在用的凝血活酶所测两种血浆的PT及其比值均较接近,而三个参考实验室用所发凝血酶原所测结果1、2号实验室相近,与3号实验室相差较远,均大于5秒,3号实验室所发凝血酶与本实验室结果接近,1号及2号两种凝血酶原结果相差4—5秒。在八十多个参加实验室测定中所发凝血酶原亦较各实验室自用凝血酶原结果为长。

今后 PT 测定规范化试剂规格的意见

一. 试剂规范化

我国凝血活酶试剂生产厂家不少,但大多未形成规模,还有不少实验室使用自己配制的凝血活酶,就更无法保证质量,更无法确定 ISI 值。凝血活酶有不仅稳定性、重复性等特点要求符合规格,而且其敏感度亦是非常重要的指标,即不仅在用于正常人血浆确定能保持在一个正常范围内(为 11—13 秒),而对于抗凝治疗来说重要的一点是抗凝药所致的抗凝缺陷有足够的敏感性,即正常和异常血浆的差值越大敏感度越高。用人脑的提取物敏感度最高,其他动物组织提取物较低,用国际敏感度指数 (ISI) 表示之。WHO 的 IRP、BCT/253 系人脑制剂,其敏感度很高,ISI=1,ISI 越高则其敏感性越低,因凝血活酶来源有人、兔、牛、猴等脑或其它组织,其敏感度相差很多,所以对每批凝血活酶制品均应定出 ISI,以便使所得结果有可比性。

今后卫生部临床检验中心将制备 NRP,除对厂家生产的凝血活酶制品进行整顿检测外,要求产品出厂都应标有各自产品在手工或某种仪器使用中的 ISI,并应提供可靠的正常、异常参比血浆。

二. 检测方法的规范化:推荐 ICSH 及 ICTH 公布的暂定参考方法

1. 血标本:

1)用硅化或塑料注射器抽取静脉血,注入有盖塑料试管。

2)9 份血液加入一份 109mM 枸橼酸钠抗凝剂(32g/L 含 2 个分子结晶水的枸橼酸钠)。

3)将标本及时离心,必须将血浆与红细胞层分离,标本宜在二小时内测定,时间过久 V 因子可能在室温中消失,以及 VII 因子可在冷的条件下活化。

2 测定条件:

1)必须在 36.5—37.5℃ 温度下进行操作。

2)混合等体积的枸橼酸抗凝血浆,凝血活酶及 25mM 的氯化钙溶液,并记录凝固时间,也可采用凝血活酶与氯化钙溶液预先混和,后加入血浆的方法。

3)试剂在试验前必须预温至测定温度,但预温时间不能超过 30 分钟。

4)血浆加入全部试剂后的混合液,PH 必须在 7.2—7.4。

5)凝固时间的终点,可用自动仪器或者用能够保持正确温度的手工操作观察,并防止凝固终点误差,每次测定做双份,取平均值报告。

6)所用的测试系统必须用正常和异常的参比血浆进行测试,其 PT 结果必须在 7 天或以上的累计平均值的 2SD 范围以内,试剂和参比物的批号都必须记录,水浴和温度须做定期检查。

三. 报告方式的规范化

现在国内报告方式仍以秒、比率及活动度报告,因所购凝血活酶绝大多数都未给出 ISI 值,所以也无法报告 INR (国际标准化比率),所以在现阶段我们只要求在检测方法上规范化,报告上不要求按 INR 方式报告。

但由于采用不同来源的凝血活酶,其敏感度相差很大,有时测定时间和比值相差很大,但按 INR 报告可能相近,比如同一份血标本在两个实验室分别用 ISI 为 3.0 和 1.2 的凝血活酶试剂检测,其 PT 为 19.8 秒和 42 秒 9 对照标本 PT 均为 12 秒),PTR 分别为 1.64 和 3.50,结果相差悬殊,但为换算成 INR,则 $1.643 = 4.49$, $3.512 = 4.49$ 二者的 INR 相同,因此如单用 PTR 指导抗凝治疗,会产生很大偏差。

同时 ICSH 和 ICTH 指出今后医学科学论文,如果 PT 结果仅以传统方式报告,而不提供 INR 将不予接受。

所以用 INR 方式报告 PT 已是势在必行,我们目前当务之急是引进采用 WHO 推荐的 INR,建立我国的 NRP,使厂家的制品一律提供 ISI,在此基础上以 INR 报告 PT 结果。

四. 室内质控及室间质评

从我们的调查可以看到同一份标本和同一份凝血活酶最高测定结果和最低测定结果相差三倍,其比值差 1.5 倍,这中间主要是操作不统一、不规范,所以我们要强调按照推荐的方法统一操作,同时要求生产厂家提供合格的凝血活酶(一年后要标出 ISI)及正常和异常的质控血浆,各实验室在每天工作中,必须及时检测正常及异常参比血浆,并做室内质控图,以保证有可靠的测定比值,进一步标出 INR,有了问题可及时发现。国外很多国家都有法律规定,医学实验室必须参加室间质评,以保证结果可靠,有问题可尽早发现。从我们调查中看到,现在室间测定结果的 CV 值高达 23%,这样高的变异,当病人转院治疗时根本无法对比,所以必须强调,凡做凝血酶原测定的单位,都应参加室间质评,以避免该项试验处于一种各行其是、毫无控制的状态。

补充资料

一. 敏感性

指对凝血因子缺陷在凝血酶原时间延长的反应。两份不同凝活酶,在测正常人时虽然相同(如 12 秒),但在测定抗凝治疗病人的结果可以相差很多,主要是敏感度不一致,以人脑敏感度最高,现在也有将兔脑经过处理达到较高的敏感性,ISI 代表敏感性对数的倒数,即敏感性越高,ISI 值越低;反之,敏感性越低,则 ISI 值越高。经大量试验,敏感性越高(ISI 值低),测得结果秒数或比值的 CV 值越小;反之敏感度越低(ISI 值高),则 CV 值越大。

几种试剂的 ISI 值:

	仪器法	手工法
太平洋公司	1.22	1.12
东亚公司	2.2	2.3
IL 公司	2.3	

文献介绍测定 ISI 值手工法与仪器法不同,同种试剂用于不同仪器其 ISI 值也不一样,但一般试剂只标明仪器法或手法的 ISI 值,不再按不同仪器标示,经我们试验,不同试剂具有不同的 ISI 值,但测定相同标本用所给 ISI 所计算的 INR,结果很接近。

二. INR 计算方法

1. 新型仪器都有计算 INR 的功能,只要将所用试剂的 ISI 值输入,在打印测试结果秒数的同时,即可将 INR 值打印出来。

2. 用计算器算法

$INR = PTR^{ISI}$ 其敏感性与秒数的对数值成正比

$PTR \lg \times ISI \text{ 反对数}(\sec) \lg$, 所得结果为 INR

3. 查表

三. 凝血活酶的 ISI 标定法

用凝血活酶参考制品标定待测定的凝血活酶 ISI 值,需进行 10 天 PT 测定。每天测定二份正常血浆标本及六份异常血浆标本,此异常标本为接受口服抗凝剂治疗至少六周,其 INR 值已趋于稳定的病人血浆。用参考凝血活酶测定 PT,只能用手工法,被试验的凝血活酶可用手工法或自动化仪器做 PT 测定,IRP 应选择与凝血活酶同源的(为 BCT/253 和 RBC/79 分别用来较准人和兔脑

凝血活酶)十天后已用两种试剂测定了 20 个正常及 60 个香豆素抗凝治疗血浆。

将结果用对数坐标纸作图以被测试凝血活酶所得 PT 的对数值为横坐标,凝血活酶 IRP 所得 PT 的对数值为纵坐标,以直角最小乘方法求出斜率(见公式)以斜率乘以 IRP 的 ISI 值所得结果即为被测试凝血活酶的 ISI 值。

ISI 标定方法举例如下:

1. 标定过程

1)准备 ISI 的参比凝血活酶和待标定凝血活酶

2)准备正常人 2 名(1 男 1 女)及已抗凝治疗 6 周以上,INR 在 1.5—5 之间并已趋于稳定的病人 6 名,取血,抗凝分离血浆

3)测定上述 8 份血浆的凝血酶原时间,每天只作一次,不必重复,为了使 CV < 3% 应连续 10 天测定

4)假设测定如下表

标本号	国际参考制品		待标定凝血活酶	
	测定顺序	PT(秒)	测定顺序	PT(秒)
正常 1	1	15.9	2	13.8
病人 1	3	25.4	4	19.6
病人 2	5	42.6	6	30.8
病人 3	7	35.1	8	28.6
病人 4	9	25.8	10	19.6
病人 5	11	49	12	33.6
病人 6	13	45	14	38.1
正常 2	15	17.1	16	15.2

2. 计算公式: $C_{IRP, WRP} = m + (m^2 + 1)^{1/2}$

式中 $m = \frac{\Sigma(LPT_{IRP} - \overline{LPT}_{IRP})^2 - \Sigma(LPT_{WRP} - \overline{LPT}_{WRP})^2}{2\Sigma(LPT_{IRP} - \overline{LPT}_{IRP})(\overline{LPT}_{WRP} - \overline{LPT}_{WRP})}$

LPT_{IRP} = 用 IRP 测定单个 PT 的对数值

$\overline{LPT}_{IRP}$ = 用 IRP 测定单个 PT 的对数值全部数值的均值

LPT_{WRP} = 用被标定凝血活酶测定单个 PT 的全部数值的对数值

$\overline{LPT}_{WRP}$ = 用被标定凝血活酶测定单个 PT 的对数值的均值

Σ = 全部血浆(正常及病人)的总和

$ISI_{WRP} = ISI_{IRP} \times C_{IRP, WRP}$

ISI_{WRP} 的标准误(SE)按下公式计算

$SE(ISI_{WRP}) = ISI_{IRP} \times SE(C_{IRP, WRP})$

$SE(C_{IRP, WRP})$ 按下述公式计算

$SE(C_{IRP, WRP}) = \left\{ \frac{[(1+C^2)U+VC] \times VC}{nu^2} \right\}^{1/2}$

式中 n = 测试血浆总数(病人及正常标本)

$$C = C_{\text{IRP.WRP}}$$

$$u = \frac{\sum (LPT_{\text{IRP}} - \overline{LPT}_{\text{IRP}})(LPT_{\text{WRP}} - \overline{LPT}_{\text{WRP}})}{n}$$

$$V = \frac{\{\sum (LPT_{\text{IRP}} - \overline{LPT}_{\text{IRP}})^2 - C \sum (LPT_{\text{IRP}} - \overline{LPT}_{\text{IRP}})(LPT_{\text{WRP}} - \overline{LPT}_{\text{WRP}})\}}{n - 2}$$

ISI_{WRP} 的变异系数为 $100 \times SE(ESI_{\text{WRP}}) / ISI_{\text{WRP}}$

3. 计算 第一表测试结果如下表

测试结果表

I R P					待标定凝血活酶						
序号	结果(秒)	X(lg 秒)	$\bar{X}$	$X-\bar{X}$	$(X-\bar{X})^2$	序号	结果(秒)	Y(lg 秒)	$\bar{Y}$	$Y-\bar{Y}$	$(Y-\bar{Y})^2$
1	15.9	1.201	1.470	-0.27	0.0729	2	13.8	1.139	1.369	-0.23	0.0529
3	25.4	1.404		-0.066	0.0044	4	19.6	1.292		-0.077	0.0059
5	42.6	1.629		0.158	0.025	6	30.8	1.488		0.118	0.0139
7	35.1	1.545		0.075	0.0056	8	28.6	1.456		0.087	0.0075
9	25.8	1.411		-0.06	0.0036	10	19.6	1.292		-0.077	0.0059
11	49	1.690		0.22	0.0484	12	33.6	1.526		0.157	0.0246
13	45	1.653		0.182	0.0331	14	38.1	1.581		0.212	0.0449
15	17.1	1.232		-0.238	0.0566	16	15.2	1.181		-0.188	0.0353

$$\sum (X - \bar{X})^2 = 0.2496$$

$$\sum (Y - \bar{Y})^2 = 0.191$$

$$m = \frac{0.2496 - 0.191}{2 \times 0.21} = 0.1363$$

$$C_{\text{IRP.WRP}} = 0.1363 + (0.1363^2 + 1)^{1/2} = 1.1455$$

$$\text{如 } ISI_{\text{WRP}} = 1.04 \times 1.1455 = 1.191$$

$$\text{则 } u = 0.21484 / 8 = 0.026855$$

$$v = 0.2496 - 1.1455 \times 0.21484 / 8 - 2 = 0.0035$$

$$SE(C_{\text{IRP.WRP}}) = \left\{ \frac{[(1 + 1.1455^2) \times 0.026855 + 1.1455 \times 0.0035] \times 1.1455 \times 0.0035}{8 \times 0.026855^2} \right\}^{1/2} = 0.214$$

$$SE(ESI_{\text{WRP}}) = 1.04 \times 0.214 = 0.222$$

$$CV = 100 \times 0.222 / 1.191 = 18.4\%$$

四. 平均正常 PT 的求法

理想的平均正常 PT, 是每天由 20—30 份鲜正常血浆计算而求得。然而在大多数实验室这是不实用的, 但至少每购一批凝血活酶试剂应该用 20 名健康成人的新鲜血浆标本测定其正常 PT 的平均值, 应避免用冻干血浆或试剂说明书上给出的正常值去计算正常 PT 平均值。根据 WHO 指导文件, 正常 PT 平均值不是数学均值(全部正常血浆的 PT 总和除以血浆标本数), 而是几何均值[计算出全部的 PT 对数的总和除以标本数, 求此商的反对数即为几何均值即正常 PT 均值 = 反对数 $(\sum \lg X \div N)$ 此处 x 相当 PT]几何均数受非随机(如男女数目不等, 年龄范围不充足等)或正常血浆局外值的影响较数学均数为小。

五. 影响因素及注意事项

(一) 标本收集: 抗凝比例适当, 标本无污染

1. 取血后不能延迟立即混匀。
2. 不能产生泡沫。
3. 要用塑料或经硅化的玻璃管, 空针必须干燥。
4. 混浊、黄疸、高血脂、严重溶血可影响结果。

5. 含有未除净的细胞,冻融后可影响结果。
6. 急性炎症反应,纤维蛋白原升高,可使 PT 缩短。
7. 血球压积超出 20—55%,可使浆的抗凝水平不合适。

(二)检测技术应注意

1. 空气中暴露过久的血浆 PH 升高,应加盖。
2. 温度准确非常重要,应每日检查加温器械。
3. 所有反应的试管器皿必须清洁,不含残留的清洁剂
4. 血浆保存 4—8℃,可使第Ⅵ因子产生冷激活导致 PT 的明显减短
5. 使用凝血仪器进行测定应遵照厂家的建议做好仪器保养工作

(三)干扰因素

下列药物可使 PT 延长:类固醇、EDTA、口服避孕药、阿斯匹林、红霉素、乙醇、四环素、抗凝药物如肝素和华法令。

下列药物可使 PT 缩短:抗组织胺药物、丁基巴比妥、咖啡因、口服避孕药、酚基巴比妥及 VK。

(四)正常参考值

每个实验室应建立自己的自己参考值(范围),一般选用 20 或更多的代表参考人群的个体进行测定,以其均值±2SD 作为参考范围。根据下列条件选择代表参考人群的个体。

1. 选择 18—45 岁数量相近的男性及女性
2. 应仔细的筛选去掉服下列药物的人员:激素、抗菌素、口服避孕药、降压药。
3. 采血前不能有剧烈运动。
4. 采血应空腹或只服少量无脂类食物,可得到无混浊满意的标本。

用上述的参考人群,其 PT 范围在 10—14 秒,异常标本质控物的 PT,依各批凝血活酶的 ISI 值而不同。ISI 值越低则曲线越陡峭,各试验室应根据所用仪器试剂、采血方法及所用抗凝剂建立正常参考值。有重要改变,应重新建立试剂,换批号亦应核对一次。

(五)有些 PT 试剂含 NaN_3 ,易沉积于下水道, NaN_3 为易爆物,应引起注意。

Hct>55%,<20%,按下列公式使用抗凝剂:

$$0.00185 \times \text{血(ml)} \times (100 - \text{Hct}) \text{ 如 Hct 为 } 58\%, 0.00185 \times 3 \times (100 - 58) = 0.233\text{ml}$$

采取标本后应混匀尽快送到实验室

用 PPP 或 PFP 做测定

含 PIt 可提高一些凝血因子,使 PT 缩短

不即刻做,应将血浆与血球分开放置

室温内可存放 2 小时

2—4℃可放 4 小时

—20℃可放 2 周

—70℃可放半年

附不同试剂测定标本 INR 值比较

太平洋试剂

ISI:1.22

正常对照:12.5 秒

异常血浆:26.2 秒

PTR:2.1

INR:2.47

东亚试剂

ISI:2.2

正常对照:13秒

异常血浆:19.5秒

PTR:1.5

INR:2.5

对所使用凝血活酶 ISI 标定值可靠性的检测方法

1. 用已知标定 INR 的参比血浆检验:

例 1. 有已知标定 INR 的参比血浆二份:一份为 INR1.5,一份为 INR3.2,所购凝血活酶标明 ISI 值为 1.8,用来测定 INR1.5 血浆,二次平均 PT 值为 15.7 秒;测定 INR3.2 血浆,二次平均 PT 值为 23.8 秒;测定二份正常血浆,平均值分别为 12.4 秒、及 11.8 秒。用公式 $INR = PTR^{ISI}$ ($INR = \text{antilg}[(\lg PTR) \times 1.8]$)

计算 INR

正常 PT 值 = $(12.4 \text{ 秒} + 11.8 \text{ 秒}) \div 2 = 12.1 \text{ 秒}$

$INR_{1.5} = \text{antilg}[\lg(\frac{15.7}{12.1}) \times 1.8] = 1.59$

$INR_{3.2} = \text{antilg}[\lg(\frac{23.8}{12.1}) \times 1.8] = 3.37$

与原定值 1.5 及 3.2 分别相差 0.09 及 0.17

因标定 ISI 值可有 10%左右的变异,不同仪器测 PT,也可引入一定误差,故相差 $\pm 0.2INR$ 以内,可以使用。

例 2. 用此二份 INR 定值参比血浆,所购凝血活酶标时 ISI 值为 2.1,用来测定 INR1.5 血浆 PT 为 17.6 秒,INR3.2 血浆,PT 为 25.1 秒,二份正常血浆分别为 12.7 秒及 13.3 秒。

计算 INR

正常 PT 值 = $(12.7 \text{ 秒} + 13.3 \text{ 秒}) \div 2 = 13.0 \text{ 秒}$

$INR_{1.5} = \text{antilg}[\lg(\frac{17.6}{13}) \times 2.1] = 1.89$

$INR_{3.2} = \text{antilg}[\lg(\frac{25.1}{13})] = 3.98$

与原定值 1.5 及 3.2 分别相差 0.39 及 0.78

与原定值相差达 25%左右,可能 ISI 标定不够准确,最好经过进一步考核再使用此种凝血活酶。

2. 用其它标定 ISI 的凝血活酶与购的标定 ISI 的凝血活酶对比。

按常规方法取二份抗凝治疗病人抗凝血浆及二份正常人抗凝血浆。

例 1:原用的凝血活酶 ISI 值为 1.14,测定结果病人 1,PT 为 18 秒;病人 2,PT 为 20 秒;正常人分别为 11.9 秒及 12.5 秒。

计算 INR

用原凝血活酶

正常人 PT 值 = $(12.7 \text{ 秒} + 12.9 \text{ 秒}) \div 2 = 12.8 \text{ 秒}$

病人 1: $INR = \text{antilg}[\lg(\frac{18}{12.8}) \times 1.14] = 1.47$

病人 2: $INR = \text{antilg}[\lg(\frac{25}{12.8})] \times 1.14 = 2.14$

用新购凝血活酶

正常人 PT 值 = $(11.9 \text{ 秒} + 12.5 \text{ 秒}) \div 2 = 12.2 \text{ 秒}$

病人 1: $INR = \text{antilg}[\lg(\frac{16}{12.2}) \times 1.14] = 1.47$

病人 2: $INR = \text{antilg}[\lg(\frac{20}{12.2}) \times 1.7)] = 2.31$

新购凝血活酶与原用凝血活酶分别相差 0.11 及 0.17 可以使用。

练习题

1. 有定值参比值血浆二份, INR 为 2.0 及 3.3, 新购凝血活酶 ISI 值为 2.0, 测定 INR2.0 的血浆为 18.1 秒, INR3.3 的血浆为 23.2 秒, 测定二份正常人分别为 12.3 秒及 12.7 秒. 问此新购凝血活酶可否使用?

2. 有定值参比血浆二份, INR 分别为 1.8 及 3.5, 新购凝血活酶 ISI 值为 2.4. 测定 INR1.8 的血浆 PT 为. 15.4 秒, INR3.5 血浆 PT 为 20.5 秒, 测定二份正常人分别为 12.5 秒及 13.5 秒, 问此新购凝血活酶是否可用?

3. 原用凝血活酶 ISI 值为 1.14, 测定病人 1, PT 为 19 秒; 病人 2, PT 为 29 秒; 正常人 1, 为 12.3 秒; 正常人 2, 为 12.8 秒。

新购凝血活酶 ISI 值为 2.1, 测病人 1, PT 为 16.5 秒; 测病人 2, PT 为 20.7 秒; 测定正常人 1 为 12.5 秒; 正常人 2, PT 为 13.1 秒, 此新购凝血活酶是否可用?

4. 原凝血活酶 ISI 值为 1.3, 测定病人 1 PT 为 19 秒, 病人 2 PT 为 28 秒, 正常人为 13 秒, 正常人 2 为 12.2 秒, 新购凝血活酶 ISI 值为 2.0, 测定病 1 PT 为 18.5 秒, 病人 2 PT 为. 23.4 秒, 正常人 1PT 为 12.9 秒, 正常人 2PT 为 13.1 秒, 问此新购凝血活酶是否可用?

5. 现新生产凝血活酶试剂一批, 用 NRP 进行标定。

NRP 的 ISI 为 1.30 测定结果如下表				
标本号	NRP		待标定凝血活酶	
	测定顺序	PT(秒)	测定顺序	PT(秒)
正常 1	1	12.3	2	13.0
病人 1	3	40.0	4	32.1
病人 2	5	37.2	6	30.0
病人 3	7	19.2	8	15.4
病人 4	9	31.4	10	25.7
病人 5	11	25.1	12	20.5
病人 6	13	18	14	15
正常 2	15	12.5	16	12.6

请计算, 待标定凝血活酶的 ISI 及 CV 值。

尿液常规自动化检查应注意质量控制

解放军总医院

丛玉隆

尿液常规检查的临床意义众所周知。随着自动化程度的不断普及,不但提高了实验的精密性和敏感性,也为临床快速诊断提供了可靠的实验依据。但许多中间环节和影响因素都直接影响尿液自动化分析的准确性,不合理的应用会带来实验结果误差,甚至延误诊断。为了加强尿液自动化分析的质量控制,我们参考有关文献和工作中的体会,对当前国内在应用尿液自动化检测中的有关问题阐述如下,供同道们参考。

一. 膜块各项常规检查原理及质控中应注意的问题

1. 尿 pH 检查

尿 pH 检查的原理是膜块区含有甲基红(pH 阈值 4.6—6.2)和溴麝香草酚兰(PH 阈值 6.7—7.5),两种酸碱指示剂适量配合可反映尿 pH 4.5—9.0 的变异范围。检测时尿标本必须新鲜,放置过久细菌分解尿液成分可导致 pH 改变。试纸条应按规定的时间浸泡,浸泡时间过长,尿 pH 呈减低趋势。尿 pH 检测不仅可了解体内酸碱平衡情况,还可监控尿 pH 变化对其他膜块区反应的干扰作用,如尿蛋白测定、尿比重检查受尿 pH 影响很大。

2. 尿比重检查

尿比重曾采用悬浮法和折射仪法,主要测定尿内固体物浓度。十项尿液分析仪的问世,试纸法得到广泛使用,具有简单快速、用量量少、不受人为因素影响等优点。其原理是采用经过处理的多聚电解质(甲乙稀酸马来酐)的 P_{ka} 改变与尿液离子浓度相关,试纸条中的多聚电解质含有随尿标本中离子浓度而解离的酸性基团,离子浓度越多,酸性基团(氢离子浓度)解离越多,使膜块中的 pH 改变,这种改变可由膜块中的 pH 指示剂(溴麝香草酚兰)的颜色变化显示出来,进而换算成尿液的比重值。在应用中应注意:①尿液标本必须新鲜,不能含有强碱、强酸性物质(如药物等),当尿液 $P \geq 7$ 时,应在测定结果的基础上增加 0.005 作为由于尿液 pH 损失的补偿。②尿液中非离子化合物增多(如葡萄糖)时,可导致尿比重悬浮法和折射仪法测定结果偏高,而试纸法只与离子浓度有关,不受影响。③尿液中蛋白增多时,三种方法都有不同程度的增加,以试纸法最为明显,折射仪法次之。④试纸法不宜用于新生儿尿比重检查,这可能是由于新生儿尿比重在 1.002—1.004 之间的缘故。由于试纸法尿比重结果间隔较大,过高或过低的尿比重测试不够敏感,因此只能用于筛选,病理性特别是系统观察的病例仍以悬浮法更为理想。NCCLS 建议折射仪结果用作为尿试纸的参比方法,比重计法不再使用。折射仪法可用去离子水或蒸馏水,SG 为 1.000;和已知浓度溶液监测比重:如 0.513mol/L (3%W/V) 的氯化钠,SG 为 1.015;0.856mol/L (5%W/V) 的氯化钠,SG 为 1.022;0.263mol/L (9%W/V) 的蔗糖,SG 为 1.034。

3. 尿蛋白检查

自动化仪器尿蛋白测定是根据指示剂蛋白误差原理,膜块中有酸碱指示剂—溴酚兰(pH 阈值为 3.0—4.6)、枸橼酸缓冲系统和表面活性剂。在 pH 3.2 时,溴酚兰产生阴离子,与带阳离子的蛋白质(白蛋白)结合后发生颜色变化。试纸法测定尿蛋白操作简单快速,敏感性高,但在使用中应注意:①尿液必须新鲜,变质的尿液产生的 pH 变化,影响实验结果。②病人服用奎宁,奎宁丁和噻呢等药物引起的强碱尿(pH > 9.0)时,会出现假阳性结果。鉴别方法是用稀醋酸将尿液 pH 调至 5—7,再行实验,借以区别是否由于强碱尿而导致的假阳性。③研究证明:几十种药物可使尿蛋白检查出

现假阳性。我们曾探讨了 19 种抗生素对其影响的研究,发现青霉素族药物对其有明显的干扰作用。笔者对大剂量青霉素患者给药前后进行了尿蛋白的检测,结果表明,滴注 250 万单位组 2 小时;320 万单位组 3 小时;480 万单位组 5 小时;可能对磺柳酸法产生假阳性,试纸法产生假阴性。④要注意不同测定方法对病人尿液内不同类型白蛋白检测的敏感性不同,磺柳酸定性,双缩脲定量可以对白蛋白、球蛋白显示同样的敏感性;而试纸法测量球蛋白的敏感性,仅是白蛋白 1/100—1/50,因此对于肾病患者,特别是在疾病发展过程中需要系统观察尿蛋白含量的病例最好使用磺柳酸法(或加热醋酸法)和双缩脲法进行定性和定量实验。⑤标本内含有其它分泌物(如生殖系统)或含有较多细胞成分时,可引起假阳性,这种蛋白尿绝非泌尿系统病变所致。最近德国 BM 公司生产了一种新型尿蛋白检测试纸条,将层析技术与免疫方法融合一体,较好地解决了干扰因素的影响,但只能测量微量白蛋白,对球蛋白仍无反应。NCCLS 建议磺柳酸法作为膜块检测尿蛋白的参比方法。

4. 尿糖测定

试纸法测定的原理是葡萄糖氧化酶把葡萄糖氧化成葡萄糖醛酸和过氧化氢,后者再由过氧化氢酶催化释放出 $[O]$,使色源呈现不同的颜色变化。其优点在于:①特异性强,只与葡萄糖反应;②灵敏度高,葡萄糖含量为 0.3~0.5g/L 即可出现弱阳性;而班氏法在 1.5g/L 才呈弱阳性表现。但两者测量的成分不同,试纸法仅与葡萄糖反应,而班氏法可测量尿内所有还原性糖(葡萄糖、乳糖和半乳糖等)。在两法实验结果不一致时,应考虑到其它还原性糖干扰。尿液含有对氧亲和力较强的还原物质(如维生素 C),既可与班氏法中的离子作用产生假阳性;又能对在低浓度(14mmol/L)尿糖时,与干化学法试纸上试剂发生竞争性抑制反应呈假阴性。排除的方法是:先将尿液煮沸几分钟后,再进行实验。由于尿液中维生素 C 的存在给干化学尿检查带来许多问题,究竟多大剂量用药后,多长时间对实验结果有干扰,是分析前质控中的重要问题。为此我们观察了 6 例静脉滴注维生素 C(2g/50ml 盐水 30 分钟滴毕),9 例口服维生素 C(1 次口服 300mg)给药前及用药后半,1,2,3 小时尿内维生素 C 浓度及对尿干化学检查的影响,结果发现 6 例静注者排泄维生素 C 的浓度有异,但趋势是一致的,滴入 30 分钟后呈高峰(389mg/dl→846mg/dl),4 小时明显减低(34mg→241mg/dl)。由于个体差异,不同人在同一时相维生素 C 的排泄不同,很难肯定服药后几小时内尿内维生素 C 不干扰实验,但有一定规律性,6 例中有 5 例(维生素 C 浓度为 34 mg→164mg/dl),给药后第四小时尿糖测定不受干扰,但潜血受干扰。口服 300mg 第三小时时维生素 C 仅为 5.3 mg/dl(X),此浓度不足于干扰任何膜块的化学反应。为避免维生素 C 对结果的影响,应选择抗维生素 C 干扰试纸条(如有的试条可抗浓度为 1000mg/L 维生素 C 的干扰)或使用含有检测维生素 C 的膜块的试条(如“尿 11 项”试条)。”

5. 尿酮体检查

检测尿酮体的膜块中含有亚硝基铁氰化钠可与尿液中的乙酰乙酸、丙酮产生紫色反应。其对乙酰乙酸的敏感性 5-10mg/dl,对丙酮仅为 40-70mg/dl,不与 β -羟丁酸起反应。这点与酮体粉法明显不同,同一病理标本,两种方法可能出现截然不同的结果,结果分析时应特别注意。不同病因引起的酮症,酮体的成分可不同,即使同一病人不同病程也可有差异。在糖尿病酸中毒早期病例中,主要酮体形式是 β -羟丁酸,乙酰乙酸很少或缺乏,此时测量可导致对总酮体量估计不足。在糖尿病酮酸中毒症状缓解之后,乙酰乙酸含量反而比初始急性期含量高。因此检验人员必须注意病程和发展,与临床医生共同分析实验结果的可靠性,这是分析后质控的重要内容。由于尿酮体中的丙酮和乙酰乙酸都具有挥发性,乙酰乙酸更易受热分解成丙酮,尿液被细菌污染后,酮体消失。因此,尿液必须新鲜,及时送检。

6 尿胆红质、尿胆原检查