

免疫诊断试剂 实用技术

唐秋艳 王云龙 陈兴业 主编

MIANYI ZHENDUAN
SHIJI SHIYONG JISHU



 海洋出版社

免疫诊断试剂实用技术

唐秋艳 王云龙 陈兴业 主编

海洋出版社

2009年·北京

图书在版编目 (CIP) 数据

免疫诊断试剂实用技术/唐秋艳, 王云龙, 陈兴业主编. —北京: 海洋出版社,
2009. 8

ISBN 978 - 7 - 5027 - 7530 - 8

I. 免… II. ①唐…②王…③陈… III. ①免疫诊断 - 诊断剂 IV. R981

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2009) 第 130450 号

责任编辑: 白 燕

责任印制: 刘志恒

海洋出版社 出版发行

<http://www.oceanpress.com.cn>

北京市海淀区大慧寺路 8 号 邮编: 100081

北京海洋印刷厂印刷 新华书店发行所经销

2009 年 8 月第 1 版 2009 年 8 月北京第 1 次印刷

开本: 787mm × 1092mm 1/16 印张: 20.25

字数: 480 千字 定价: 50.00 元

发行部: 62147016 邮购部: 68038093 总编室: 62114335

海洋版图书印、装错误可随时退换

《免疫诊断试剂实用技术》编委会

主编：唐秋艳 王云龙 陈兴业

编委：（按姓氏笔划排列）

王云龙 王法云 王 鹏 史 楠 李 瑾

赵 阳 汤 剑 陈兴业 陈绮名 唐秋艳

高喜梅 桑平阳 察雪湘

序

免疫诊断技术越来越广泛地应用在临床检验、生物学研究中，发挥着越来越大的作用，因而得到了业界同仁的重视。近 20 年来，免疫诊断试剂在检测诸如 AIDS 等病毒病需求的促进下得到了快速发展。然而，正像其他门类的学科发展一样，其技术水平的提高是没有巅峰的。作者从 20 世纪 80 年代初开始从事免疫诊断试剂的研究、开发和生产，在该领域进行了可贵的探索，积累了宝贵的经验。作为我国在该领域的最早开拓者之一，作者集其近 30 年从事免疫诊断试剂研究生产的经验以及对本行业国内外先进技术的了解，编著了《免疫诊断试剂实用技术》一书。作为与作者有着 20 多年科研协作伙伴，我为其专著的出版甚感高兴。

本书内容包括标本采集、免疫基础知识、免疫诊断技术常用的酶、放射免疫诊断技术、酶免疫测定技术、胶体金免疫技术、化学发光免疫诊断技术、荧光免疫技术、PCR 技术的基本原理等，同时还包括常用仪器、生物危害与安全防护、诊断试剂的质量评价、诊断试剂的质量监督管理等。

本书集基础理论、生产技术与质量监督管理为一体，具有很高的实用价值，是一部免疫诊断试剂生产、科研、临床检验及教学的实用工具书。相信《免疫诊断试剂实用技术》的付梓问世，必将对该领域的相关人员起到帮助借鉴作用，为我国免疫诊断技术的提高作出新的贡献。

中国疾病预防控制中心病毒病所



2009 年 4 月

前 言

免疫诊断试剂是利用抗原与特异性抗体互相结合的反应来进行定性或定量的，免疫诊断技术是现代最灵敏、应用最广泛的微量和超微量诊断技术之一。检测抗原抗体特异性好、灵敏度高、操作简便、便于实现机电一体化，免疫诊断技术依据其方法学，可以分为：反射免疫法、荧光免疫法、化学发光免疫法和酶联免疫法等。它涉及生物学、医学、化学、环境学和材料科学等多学科领域。体外诊断试剂是伴随着医学检验学的发展而产生的，而临床诊断试剂的产业化发展又极大地推动了新的科学技术在医学检验学、基础医学和药理学等学科的发展应用。免疫诊断产品在目前所有诊断试剂产品中的发展速度是最快的。据统计 2007 年，全球体外诊断产业规模在 200 亿美元的水平，而中国的行业规模目前只有 30 亿~50 亿元人民币的年营业额，年均增长率为 20%~30%。其中仪器设备占 50%~60%。据统计，临床化学市场占 34% 的份额，免疫学诊断试剂占 29%，血糖检测占 14%，血液学占 7%，微生物学占 5%，血库占 4%，核酸探针占 3%，其他（包括凝结剂）占 4%。目前我国免疫诊断技术已基本达到国际同期水平，有些已经达到国际先进水平。

国家食品药品监督管理局为使体外诊断试剂生产厂家健康有序的发展，相继出台了相关政策和规定来改善生产环境，提高生产人员的质量意识，规范生产及质量管理，提高产品质量。

本书主要是为免疫诊断试剂研究与生产人员提供参考资料，使免疫诊断技术不断提高。

由于自身的学术水平、技术水平、业务水平和实践经验有限，书中有些方面可能还存在一些欠缺，不当之处在所难免，恳请有关专家、学者及广大读者批评指正。

编者

2009 年 3 月

目 录

第 1 章 标本的采集与保存	(1)
1.1 血液标本的采集与处理	(1)
1.2 尿液标本的收集与处理	(10)
1.3 粪便标本的采集和处理	(16)
1.4 精液检查	(20)
1.5 前列腺液检查	(21)
1.6 阴道分泌物的收集和处理	(22)
第 2 章 免疫基础知识	(24)
2.1 抗原	(24)
2.2 抗体	(30)
2.3 抗原的制备	(39)
2.4 抗体的制备	(52)
第 3 章 免疫诊断技术常用的酶	(59)
3.1 酶的概念与发展	(59)
3.2 酶的作用特点	(61)
3.3 酶的催化反应动力学	(63)
3.4 酶的保存	(66)
3.5 酶的测定技术	(66)
3.6 酶在医药方面的应用	(69)
3.7 免疫分析常用的酶	(72)
第 4 章 放射免疫分析诊断技术	(79)
4.1 放射免疫分析诊断技术	(79)
4.2 放射免疫的测定方法	(84)
4.3 放射免疫分析法的建立	(87)
4.4 免疫放射分析	(90)
4.5 生产和使用放射免疫诊断试剂(盒)的卫生防护	(92)

第5章 酶联免疫诊断技术	(95)
5.1 酶联免疫测定方法及原理	(95)
5.2 酶联免疫诊断试剂的组成	(103)
5.3 酶免疫的反应条件及质量控制	(112)
5.4 ELISA 中常见问题及解决方法	(118)
5.5 ELISA 的应用实例	(128)
5.6 临床意义	(129)
5.7 酶联免疫吸附测定的局限性	(130)
第6章 胶体金免疫技术	(132)
6.1 胶体金与免疫金的特性	(132)
6.2 胶体金的制备	(135)
6.3 免疫金的制备	(140)
6.4 免疫金测定技术	(148)
6.5 免疫金组织化学技术	(152)
6.6 胶体金类诊断试剂的生产	(155)
6.7 胶体金诊断试剂的生产及质量控制	(157)
6.8 免疫胶体金技术应用前景	(160)
第7章 化学发光免疫诊断技术	(163)
7.1 化学发光免疫技术概述	(163)
7.2 化学发光剂	(165)
7.3 化学发光酶联免疫技术	(168)
7.4 化学发光酶联免疫技术的应用	(174)
7.5 生物发光酶联免疫分析	(178)
7.6 化学发光酶联免疫法的应用	(181)
第8章 荧光免疫技术	(184)
8.1 荧光免疫技术概述	(184)
8.2 荧光抗体的质量控制	(191)
8.3 荧光免疫显微技术	(193)
8.4 荧光偏振免疫技术	(195)
8.5 时间分辨荧光免疫技术	(196)
8.6 荧光酶联免疫技术	(200)
第9章 PCR 技术	(204)
9.1 PCR 技术的基本原理	(204)

9.2	PCR 技术的特点	(205)
9.3	PCR 反应体系与反应条件	(206)
9.4	PCR 扩增产物的分析方法	(209)
9.5	PCR 常用技术	(211)
9.6	免疫 PCR 技术的应用	(217)
9.7	PCR 临床应用领域	(220)
第 10 章	其他免疫技术及免疫技术新进展	(222)
10.1	非标记免疫反应	(222)
10.2	免疫技术新进展	(228)
第 11 章	免疫诊断试剂常用仪器与设备	(233)
11.1	酶标仪	(233)
11.2	发光免疫分析仪	(234)
11.3	荧光分光光度计	(237)
11.4	点金标机	(239)
11.5	可编程切条机	(240)
11.6	金标免疫定量分析仪	(241)
11.7	洗板机	(242)
第 12 章	生物危害与安全防护	(244)
12.1	生物安全的含义	(244)
12.2	生物安全性评价	(248)
12.3	生物危害的防护措施	(249)
12.4	国内外生物安全法规	(253)
第 13 章	诊断试剂的质量评价	(262)
13.1	室内质量评价的意义	(262)
13.2	诊断试剂质量评价的基本概念	(263)
13.3	室内质量控制	(266)
13.4	室内质量评价	(272)
13.5	室内质评结果评定	(273)
第 14 章	体外诊断试剂的质量监管	(287)
14.1	外诊断试剂在临床中的重要作用	(287)
14.2	体外诊断试剂发展历程	(288)
14.3	国内外体外诊断试剂发展概况	(289)

14.4	体外诊断试剂的注册管理	(290)
14.5	药品生产质量管理规范(GMP)	(298)
14.6	体外诊断试剂生产企业的质量体系基本要求	(303)
14.7	GMP 与 ISO9000 的比较	(308)
参考文献		(310)

第1章 标本的采集与保存

1.1 血液标本的采集与处理

1.1.1 概述

血液是由占45%的血细胞（红细胞、白细胞、血小板）和占55%的血浆（plasma）组成的红色黏稠液体。正常成人的血液总量占体重的6%~8%，成人平均约5000mL（妊娠期血量可增加23%~25%）。血液的红色来自红细胞内的血红蛋白，因红细胞含氧量不同而异。含氧量多的动脉血呈鲜红色；含氧量少的静脉血呈暗红色。血浆（或血清）因含少量胆红素，呈透明淡黄色；如含乳糜微粒，则呈乳白色混浊；如发生溶血，则呈红色。血液不加抗凝剂而自行分离出来的黄色透明液体为血清（不含纤维蛋白原），加抗凝剂后所分离出来的黄色透明液体称血浆（含纤维蛋白原）。血浆中水分占91%~92%，固体成分占8%~9%，包括7%的蛋白质（白蛋白、纤维蛋白原、球蛋白、凝血酶原等）；0.9%的无机盐类（钠、钾、氯、钙、镁、磷等）；其他约占0.8%，如非蛋白氮（尿素、尿酸、肌酸、肌酐等）、脂肪、磷酸类、胆固醇、葡萄糖、激素、维生素、抗体、酶等。血液的比重为1.050~1.060，pH值为7.35~7.45，相对黏稠度为4~5，正常人血浆在标准状态下，渗透压为678.88kPa，在37℃时为770.07kPa，与0.9%氯化钠溶液的渗透压相等。

血液通过循环系统与全身各组织器官密切联系，参与机体气体交换、运输、防御、调节渗透压和酸碱平衡等各项生理活动，维持机体正常新陈代谢和内外环境的平衡。临床血液学检验是采用各种实验室手段分析和研究血液的病理变化，从而阐明血液系统疾病的发生机制，协助诊断、治疗观察和判断预后的一门科学。血液检查一般可分为细胞成分的检查（即通常所说的血液常规检查）和血浆血清成分的检查（即生物化学、免疫学、血凝学、内分泌学等分析范围）。

1.1.2 血液标本的采集与保存

为了获得准确、可靠的血液检验结果，必须注意和标本的采集与保存有关的影响化验结果的因素。只有正确地采集血液标本，才能保证血液检验结果的准确性。

1.1.2.1 血液标本的采集

（1）血液标本采集前应考虑的因素

1）情绪：紧张与生气可影响神经内分泌系统，使儿茶酚胺、皮质醇、血糖、白细胞、中性粒细胞等增高。

2) 饮食: 普通进餐后, 血甘油三脂将增高 50%, 血糖增加 15%, 丙氨酸氨基转移酶及血钾增加 15%。高蛋白膳食可使血尿素、尿酸及血氨增高; 高脂肪饮食可使甘油三酯大幅度增高, 被采血者当天饮食, 巧克力对脂肪血影响程度最大, 且食后造成的脂肪血在血液内停留时间大于 4h; 肉制食品及豆浆、油饼对脂肪血有很大的影响; 采血前应控制此类饮食; 牛奶对少数人(40%)有轻度影响, 且食后 2h 内采血不会造成脂肪血; 鸡蛋对脂肪血无影响; 高核酸食物(如动物内脏)可导致尿酸明显增高。

3) 饮酒: 长期饮酒者可导致丙氨酸氨基转移酶、天冬氨酸氨基转移酶、 γ -谷氨酸转氨酶增高; 慢性酒精中毒者, 其血中胆红素、碱性磷酸酶、甘油三酯等增高。

4) 吸烟: 长期吸烟者血中白细胞计数、血红蛋白浓度, 碳氧血红蛋白、癌胚抗原等增高; 而免疫球蛋白 G 则减低, 血管紧张素 I 转换酶活性减低。

5) 药物

①非成瘾性

A. 乙酰水杨酸及其代谢产物因具有还原性, 可干扰 Trinder 反应导致检验结果减低;

B. 右旋糖酐干扰双缩脲法测定总蛋白, 使结果假性增高;

C. 汞化合物与氟化物可抑制尿素酶活性, 均致尿素假性减低;

D. 维生素 C、高浓度葡萄糖和一些抗生素可与碱性苦味酸反应, 引起肌酐增高;

E. 大量含氟、溴或碘离子药物治疗时, 可使血清氯偏高;

F. 长期口服避孕药可诱导肝细胞内酶合成增加, 而使 ALT 升高。

②成瘾性药物

A. 吗啡: 可使血淀粉酶、脂肪酶、丙氨酸氨基转移酶、天冬氨酸氨基转移酶、碱性磷酸酶活性增高, 又使胆红素、胃泌素、促甲状腺素(TSH)、催乳素增高, 而引起胰岛素、去甲肾上腺素、神经紧张素及胰多肽水平减低;

B. 大麻: 可增高血中钠、钾、氯、尿素、胰岛素浓度, 减低血肌酐、血糖及血尿酸;

C. 海洛因可使 PCO_2 、甲状腺素、胆固醇、血钾增高, PO_2 及清蛋白则减低。

6) 运动: 强烈的肌肉运动可明显地影响机体代谢, 使丙酮酸和乳酸明显升高, 影响 ALT 的测定。

7) 当卧位变为坐位或站位时, 体内水分由血管流向间质。大分子物质不能滤过进入组织, 在血液内浓缩, 脂肪酶和蛋白质结果会明显增高。

8) 在月经周期的 3 个不同时期, 与生殖有关的多种激素将产生不同的变化。纤维蛋白原在月经前期开始增高, 血浆蛋白质则在排卵时减低; 胆固醇在月经前期最高, 排卵时最低。

(2) 标本种类及收集方法

要获得高质量的标本, 临床医师应主动告诉患者如何配合好; 护理人员负责规范的标本采集; 运输人员要及时快速规范地转运好标本; 检验人员在实验室进行规范的标本检测、检验结果审核和报告发放。

最好做到: 其一, 采集标本前医师应认真、完整地填写检验申请单, 包括一般内容

及患者服药史、特殊病理变化、留取标本、送检标本的时间等。其二，医护人员应了解在标本采集前影响结果的非病理性因素，正确指导患者，采取切实措施，规范采集标本前患者的一切行为，保证采集的标本符合疾病的实际情况，留取合格的标本。应告诉患者：试验名称、所需标本类型、为什么要检测、检验前注意事项（如是否空腹、药物影响情况和采取措施、标本采集时间要求、生理情况如饮食习惯、烟酒嗜好、运动对结果的影响及采取措施等）、检测报告时间、如何获得结果等。其三，保证足够合格的采血人员、标准化的采血程序、合格的采血器材，标本采集容器上必须有唯一性标识（如条码）。

一般血液标本的种类分为：全血、血浆、血清、分离或浓缩的血细胞成分。全血又分为毛细血管全血标本、静脉全血标本、动脉全血标本。

按照检验目的不同，采用不同的采集部位和方法。

（1）毛细血管全血（皮肤采血）：多用于细胞记数、血红蛋白测定及仅需微量血液的检验或婴幼儿。

①部位：WHO 推荐取左手无名指指尖内侧血液做血常规检验。针刺后若流血不畅，可于穿刺点四周稍加压力。取血完毕后，用消毒干棉球稍加压穿刺伤口，以防流血；婴幼儿则可在足跟或拇趾上采血。严重烧伤病人，则视具体情况，选择皮肤完整部位采血。

②采血方法：用 75% 酒精棉球或用棉签蘸 5% 聚维酮碘溶液（又称碘伏）对左手无名指指尖进行环行消毒，待干，用左手的拇指和示指固定采血部位，右手持无菌采血针迅速刺入组织，深约 3mm，取出刺针，血液自行流出后，再用消毒干棉球擦去第一滴血；如血流不畅，可于离刺孔较远的四周稍加压力；但切忌在刺孔近处用力挤压，以免组织液混入血液影响结果。用血红蛋白吸管吸取所需量血液做检验用。采血顺序依次为：血小板记数、红细胞记数、血红蛋白检验、白细胞记数和血型等。

③注意事项：出血不止时，可用无菌干棉球压迫止血；皮肤消毒后一定要待乙醇挥发，干燥后采血，否则血细胞被乙醇破坏，且因血液会四处扩散，不易成滴造成采血困难。

（2）动脉全血：主要用于血气分析，采血部位有股动脉；肱动脉和桡动脉。

①器材准备：2mL 或 5mL 干燥注射器（以玻璃注射器为佳）、1000U/mL 无菌肝素生理盐水溶液、橡皮塞、消毒器材等。

②选择动脉：多选用桡动脉（最方便）、股动脉、肱动脉。

③采血方法：以血气分析标本为例，常规消毒患者皮肤及操作者左手食指、中指后，以左手绷紧皮肤，右手持注射器，用左手示指触摸动脉搏动处，以 60° 进针。动脉血有较高的压力，会自动注入针筒内，至 2mL 后拔出针头，嘱患者按压采血处（穿刺点）止血 10 ~ 15min。立即用软木塞或橡皮塞封闭针头（针头斜面埋入橡皮中即可），以隔绝空气，搓动注射器，使血与肝素混合，并立即送验。

④注意事项：A. 避免空气：用于血气分析的标本，采集后立即封闭针头斜面，再混匀；B. 立即送验：标本采集后应立即送检，若不能，则标本应置于 2 ~ 6℃ 保存，但不应超过 2 h；C. 防止水肿：采血完毕，拔出针头后，嘱患者用消毒干棉签按压采血处止血，不要揉，以防形成水肿。

（3）静脉全血：来自静脉的全血，血液标本应用最多。过去的静脉血采集主要采

用注射器采集法。随着血源性传染疾病的日益加剧,标本采集方法和产品的安全性日益受到医务工作者的关注。

为了解决传统标本采集方法所存在的种种弊端,人们经过长期的研究,标本采集技术不断完善和发展。目前多数实验室的静脉血采集均已采用真空采血系统(该系统由标准双向采血针头、配套持针器、无菌真空采血管组成),采血时,该系统中双向针的一端在持针器的帮助下刺入静脉,另一端插入真空采血管内,采血管中预置真空度可以准确控制采血量,与预置的适合不同实验、含量准确的相应添加剂共同作用,可保证添加剂与采血量的准确比例。血液标本在采集、混匀、运输、分类、离心整个操作过程都处于完全封闭状态,不仅安全而且严格控制了试验前影响因素。

真空采血管从根本上改变了注射器采血的各种弊端,推动了临床静脉血样采集技术的发展。标准真空采血管是采用国际通用管盖识别颜色规则的(蓝色→1:9 枸橼酸钠管,黑色→1:4 枸橼酸钠管,紫色→血常规管,绿色→肝素管,灰色→血糖管,黄色→促凝管,淡黄色→分离胶促凝管,红色→无添加剂),清晰指示采血管内添加剂种类和试验用途,便于采血人员准确辨认和使用。真空采血管侧面标签内容包括:添加剂种类、采血量、是否无菌、生产批号、失效日期、生产商和品牌名称。真空采血管管盖(安全头盖),有效避免了医务人员或患者在标本采集、运输、分发、前处理过程中接触血样的危险性。关于静脉采血针专用收集盒(桶)用硬质高分子材料,装满污染针头后可利用锁死装置完全封闭,直接高压焚烧,彻底杜绝针头重复使用和扎伤采血师或清洁工人所导致的血源性传播疾病的发生。持针器可以重复使用,若持针器被污染,应立即停用并严格消毒或弃置。

(4)下面我们将从两种方法来进一步阐述采血法,那就是普通采血法和真空采血管采血法。

①普通采血法

A. 部位:一般采用上臂静脉,肘正中静脉是最常用的静脉采血部位,因为肘正中静脉往往比较粗大、表浅,穿刺成功率相对较高,对患者造成的痛苦最小。其次是贵要静脉。当所有静脉都不明显时,应采用食指或中指触摸感觉静脉的位置决定穿刺点。让患者握拳可以使静脉更明显。如果需要,也可以使用身体其他部位的静脉,如手和腕的静脉。小儿可用颈静脉采血。必要时还可从股静脉、大隐静脉、锁骨下静脉、脐旁静脉等处采血。但从这些部位采血,必须在有经验者指导下进行,或由临床医生采集,以免发生意外事故。

B. 采血操作步骤:以肘静脉取血为例:

a. 首先选择适宜静脉,在上臂扎上压脉带,用75%酒精棉球或5%碘伏从内向外,对欲刺部位的皮肤进行环形消毒,嘱患者紧握拳头,使静脉显露。一般应选择粗直、弹性好且容易固定的静脉进行穿刺,每个人的静脉的深浅不一致,静脉深者,完全是靠手指去触摸,对于触摸不明显的只能靠经验,根据解剖位置进行穿刺。

b. 取无菌注射器,检查针头是否接牢,有无阻塞和漏气。左手拇指固定静脉穿刺部位的下端,右手持注射器,使针头斜面和针筒刻度向上,沿静脉正面将针头与皮肤成30°角先向血管旁刺入皮下,触及管壁后,再顺血管平行刺入静脉腔内,见回血后,立

即固定注射器,以免针头滑出血管。此时用左手缓缓抽动注射器针栓,至所需血量后解除止血带,放松拳头,用无菌干棉球压住穿刺部位,拔出针头。在针孔处进行局部按压3~5min进行止血。注意不要揉,以免造成皮下血肿。

c. 取下针头,将血液沿试管壁缓慢注入试管内,任其凝固。待血块收缩后,即可分离出淡黄色透明的血清。如果需要全血或血浆,则将血液注入事先准备的抗凝管中,轻轻混匀,防止凝固,即为抗凝血。经适当离心沉淀后,淡黄色上清液即为血浆。血清和血浆的主要差别是,血清中失去了纤维蛋白原。

d. 注意事项:其一,试管不干燥,不清洁,穿刺不顺利致损伤组织过多,抽血速度太快,血液注入容器时未取下针头或产生大量泡沫,过分振荡,均可造成溶血,应予以避免。其二,止血带过松或过紧影响抽血速度,过紧可造成深部动脉血流循环受阻,过松造成表浅静脉充盈不足。其三,注射器与针头应紧密衔接,勿使漏气。抽血前,应检查针尖是否锋利或带钩。其四,抽血时进针不要过深,以免穿破血管,造成皮下血肿。将针尖斜面和注射器刻度向上。其五,由于穿刺时易引起迷走神经兴奋、血管痉挛出现血管弹性不足,引起静脉塌陷,此时可放松或松开止血带,让献血者握拳即可。其六抽血时,只能外抽不能内推,以免注入空气,形成气栓,造成严重后果。采血前应;向患者者耐心解释,消除不必要的顾虑和恐惧心理。如遇个别患者采血后发生眩晕,可让其平卧休息片刻,即可恢复,亦可拇指掐(或针刺)人中和合谷穴,或吸芳香酊。

②真空采血管采血法

国际标准真空采血在基本技术上与传统注射器采血大同小异,步骤如下:

A. 准备器材:采血针、持针器、采血管、压脉带、75%酒精棉球或碘伏棉球、无菌干棉签或棉球;

B. 部位:同注射器采集法;

C. 采血操作步骤:

a. 确定患者身份,采血者首先带上一一次性手套,同时保护好自己和患者。协助患者摆好姿势,一般门诊患者宜采取坐位,病房宜采取卧位,患者应处于心理平静和空腹状态。

b. 用75%酒精棉球或5%碘伏静脉穿刺点为中心从内向外进行环形消毒,消毒范围的直径为3~5cm。消毒等待过程中防止接触此处皮肤,否则静脉穿刺点可能被污染,必须重新消毒。注意,采集血培养标本时还要给采血管和培养瓶穿刺部位消毒。

c. 患者采取坐姿,上身与地面垂直,肘部置于稳固的操作台面,采用枕垫置于肘关节下,使患者上臂与前臂呈直线,使肘部静脉伸直,在距离消毒部位上方5~7cm处绑上压脉带,应松紧适度,充分暴露静脉穿刺点。拧松并轻轻除掉针头保护用彩色硬质封套,在进针前用一只手握住患者手臂,另一只手的拇指和食指持穿刺针,沿静脉走向使针头与皮肤成30°角,快速刺入皮肤,然后成5°角向前刺破静脉进入静脉腔,见回血后,让患者松开拳头,将双向采血针的另一端直接刺入真空采血管盖中央的胶塞中,使管内真空与患者静脉相通,松开压脉带,单手继续固定持针器,管内真空自动将血标本缓缓柔和地吸入采血管,待真空耗尽,血流自行停止。

d. 观察采血管内液面波动,血液完全停止后,单手严格固定持针器,另一手拔出

采血管并立刻颠倒 5~8 次。如果需要采多管血，再向持针器内插入另一根采血管，然后重复相应步骤。当采集多管标本时，应按以下顺序：血培养瓶/血培养管→红头管→浅蓝头管→含添加剂的其他采血管（绿头管、紫头管、灰头管）→SST 金黄头管。

e. 采血完毕，用干净棉球或棉签压迫静脉穿刺点，拔出穿刺针，然后退出带针持针器，出针时用棉签轻按穿刺处，轻轻沿穿刺方向将针拔出，然后嘱咐患者加压 5min 使静脉闭合。

f. 当完成患者的静脉血液采集和采血管标记等全部操作后，需要更换包括手套在内的所有一次性相关采血物品和器械。全部废弃物均应根据国际通用安全操作规程或所在机构的规定弃置在合适的污物容器内。

g. 血样采集成功后，应尽快送检。

D. 注意事项：

a. 采血时间尽可能安排在上午 7:00~9:00 之间进行。患者在采血前应禁食 8~12h；

b. 采血应尽量避免静脉输液的干扰。若患者手臂上有一个或多个静脉输液装置，首先应考虑在静脉输液装置的对侧采血；若患者双臂都在进行静脉输液或对侧手臂不适合穿刺（如有血肿或血管太细），可以从尽量远离静脉输液部位的远心端采血，减少血样污染的可能。若这些部位不可能找到一个适合静脉穿刺的部位，可以在征得主管医师允许后从患者的脚面或踝部采血（对糖尿病患者可能会造成穿刺部位的严重感染，也可能形成血栓，造成肢端循环不良）；

c. 对于婴幼儿或儿童患者，应努力使孩子和家长的放松；而对于为隔离病区的患者采血，要遵循所在医疗机构的隔离操作规程。采血时除了携带该患者所需的全套采血器械。一般要多带一套备用的采血针、采血管和持针器，为某项试验采血失败后免于再次进出隔离病房而做好积极备份。

d. 尽可能缩短压脉带使用时间，一般应控制在 2min 以内。在做皮肤消毒时，应解开压脉带，穿刺时再绑上。

e. 采血过程中，采血管的底部应始终低于采血针前端，防止管内添加剂或血液接触采血针后端；

f. 在日常采血工作中，有时会遇到采血量达不到采血管预设的容量，或应该见到回血却见不到回血，此时有两种可能，其一是由于针头穿刺斜面时顶在静脉内壁上，阻断了血流，若是这种情况，只要将持针器沿顺时针转动 90°，血流就会通畅；若在采血的过程中血流突然中断，则可能是因为患者静脉压太小，静脉塌陷所致。此时，应嘱患者缓缓握拳松拳，促进血流恢复。其二，则是采血管插入持针器时偏斜，而造成管盖不能被双向针的后端针头穿透，即采血管并没有和患者的静脉相通，此时，需要在固定持针器的前提下调整穿刺角度，或将采血管拔出后重新插入，若仍无效，则需重新换一个的采血管。

1.1.2.2 血液标本的保存

血液标本保存应当在规定的时间内、确保标本特性稳定的条件下，按要求分为室温

保存、冷藏保存、冷冻保存。

(1) 分离后标本。若不能及时检测或需保留以备复查时,一般应置于4℃冰箱,部分需保存1个月的检测项目标本,存放于-20℃冰箱;需要保存3个月以上的标本,分离后(包括菌种)置-70℃保存。标本存放时需加塞,以免水分挥发而使标本浓缩。标本应避免反复冻融。

(2) 立即送检标本。如血氨(密封送检)、红细胞沉降率、血气分析(密封送检)、酸性磷酸酶、乳酸及各种细菌培养,特别是厌氧菌培养等标本

(3) 检测后标本。检测后标本不能立即处理掉,应根据标本性质和要求按照规定时间保存,以备复查需要。急诊标本、非急诊标本须妥善保存,在需要重新测定时,确保标本检索快速有效。保存的原则是在有效的保存期内被检测物质不会发生明显改变

(4) 标本信息的保存。保存检验标本时应包括标本信息的保存,且与分离的血浆或血清标本相对应。

1.1.3 血液的抗凝

应用物理或化学的方法,除掉或抑制血液中的某些凝血因子,阻止血液凝固,称为抗凝。能够阻止血液凝固的化学试剂或物质,称为抗凝剂或抗凝物质。临床检验常用的抗凝剂如下。

1.1.3.1 枸橼酸钠

能与血液中的钙离子形成可溶性螯合物,从而阻止血液凝固。常用于临床检验的各项实验,其使用浓度有以下几种。

(1) 0.106mol/L $C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$, 是一般常用浓度,如做血型检查等。其配方为: 31.3g/L $C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$ 。采用抗凝剂与血液比例是1:9用于凝血功能测定。

(2) 0.105mol/L $C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$, 配方为: 30.88g/L $C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$, 是国际血液学标准化委员会建议魏氏法血沉测定用。

(3) 0.109mol/L, $C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$, 配方为 32.00g/L, 是凝血象检查常用浓度。由于枸橼酸钠毒性小,也用输血保养液的成分之一。枸橼酸钠抗凝剂由于已稀释不适于细胞的计数。

1.1.3.2 乙二胺四乙酸盐(EDTA)

常用的钠盐($EDTA - Na_2$)或钾盐($EDTA \cdot K_2 \cdot 2H_2O$),能与血液内的钙离子结合成螯合物,从而阻止血液凝固。对血细胞形态和血小板记数影响很小,适用于多项血液学检查,尤其是血小板记数。因钠盐溶解度明显低于钾盐,有时影响抗凝效果,根据国际血液学标准化委员会的建议,血细胞分析仪分析血细胞用 $EDTA \cdot K_2$ 作抗凝剂。用量为 $EDTA \cdot K_2 \cdot 2H_2O$ 12~22g/L 浓度(或终浓度为1.5~2.2mg/mL 血液)在室温或温箱中待干后备用。EDTA 影响血小板聚集,不适合于凝血象检查和血小板功能试验。EDTA 浓度过高能引起红细胞和白细胞皱缩及变性。