

• 论 著 •

标本类型和离心时间对临床常用心肌损伤标志物检测结果的影响^{*}

崔 明, 鞠少卿, 景蓉蓉[△]

(江苏省南通大学附属医院检验医学中心 226001)

摘 要:目的 探讨肝素锂抗凝血浆、乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K₂)抗凝血浆、血清等 3 类标本和缩短离心时间对肌钙蛋白 I(cTnI)、肌酸激酶同工酶(CK-MB)和肌红蛋白(MyO)等心肌损伤标志物检测结果的影响。方法 使用 VITROS 5600 生化免疫分析仪检测 28 例 3 类标本的心肌损伤标志物,并进一步行 cTnI 的 EDTA-K₂ 干扰试验;将 21 例肝素锂抗凝标本在 4 000 r/min 分别离心 2 和 10 min 后检测心肌损伤标志物。采用 SigmaPlot 11.0 统计软件进行分析。结果 EDTA-K₂ 抗凝组 cTnI 比肝素锂抗凝组低约 15%,血清组 CK-MB 比肝素锂抗凝组高出大概 7%,差异均有统计学意义($P<0.05$)。干扰试验证实 EDTA-K₂ 对检测 cTnI 存在负干扰。将肝素锂抗凝标本离心 2 min 与 10 min 的心肌损伤标志物比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 肝素锂抗凝血浆、EDTA-K₂ 抗凝血浆和血清的心肌损伤标志物检测结果间存在不一致性;缩短离心时间既不影响检测结果,又能缩短标本周转时间,使临床和患者获益。

关键词:肝素锂; 乙二胺四乙酸二钾; 血清; 心肌损伤标志物; 离心

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2017.08.002 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2017)08-1049-03

Influence of different sample types and centrifugation time on detection results of myocardial lesion markers^{*}

CUI Ming, JU Shaoqing, JING Rongrong[△]

(Laboratory Medicine Center, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong, Jiangsu 226001, China)

Abstract:Objective To explore the influence of three types of sample (heparin lithium anticoagulation plasma, EDTA-K₂ anticoagulation plasma and serum) and reduced centrifugation time on the detection results of myocardial lesion markers (cTnI, CK-MB, Myo). **Methods** The levels of cTnI, CK-MB and Myo in 28 samples of 3 types were measured by using the VITROS 5600 biochemistry immunity analyzer; furthermore, the interference test of EDTA-K₂ for cTnI measurement was conducted; after 2, 10 min centrifugation time at 4 000 r/min, the myocardial lesion markers of 21 heparin lithium anticoagulation plasma samples were measured. The SigmaPlot 11.0 statistical software was used for conducting the analyses. **Results** The cTnI level in the EDTA-K₂ anticoagulation group was decreased by 15% compared with the heparin lithium anticoagulation group, and the CK-MB level in the serum group was increased by 7% compared with the heparin lithium anticoagulation group, the differences were statistically significant ($P<0.05$). The interference test results verified that EDTA-K₂ demonstrated the negative interference in detecting cTnI. The value of myocardial lesion marker of heparin lithium anticoagulation samples had no statistical difference between 2 min centrifugation and 10 min centrifugation ($P<0.05$). **Conclusion** The detection results of myocardial lesion marker in heparin lithium anticoagulation plasma, EDTA-K₂ anticoagulation plasma and serum have inconsistency. Shortening the centrifugal time will not affect the test results, and can shorten the sample turnaround time, which benefits the clinic and patients.

Key words: heparin lithium; ethylenediamine tetraacetic acid dipotassium; serum; myocardial lesion marker; centrifugation

急性冠状动脉综合征(ACS)患者需要早期诊断,以便及时采取治疗措施,挽救其生命。2015 年最新版《急性 ST 段抬高型心肌梗死诊断和治疗指南》强调“时间就是生命”的理念^[1]。当发生心肌损伤时,患者的血液中可以检测到多项指标的变化,包括肌钙蛋白 I(cTnI)、肌酸激酶同工酶(CK-MB)和肌红蛋白(MyO),其中高敏 cTnI 被推荐为首选心脏损伤标志物^[2],指南要求 cTnI 的急诊检测周期应努力达到小于 1 h^[2],以满足临床需求。因此,缩短标本周转时间(TAT)显得至关重要,而使用抗凝管获取血浆和缩短离心时间是减少 TAT 的 2 个可能因素。强生公司认可的心肌损伤标志物标本检测类型为肝素锂抗凝血浆、乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K₂)抗凝血浆和血清,但未告知上述 3 类标本在检测 cTnI、Myo 时是否存在差异。此外,不同类型标本在检测前,需耗时离心以获取血清或血浆标本。本研究拟使用 VITROS 5600 生化免疫分析仪探讨不同类型标本和缩短离心时间对心肌损伤标志物检测结果的影响。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择本院急诊和住院患者共 50 例,其中 3 类标本对心肌损伤标志物检测的影响分析(以下简称 3 类标本影响分析)使用 28 例,男 16 例,女 12 例,年龄 30~89 岁;EDTA-K₂ 对 cTnI 的干扰试验(以下简称 EDTA-K₂ 干扰试验)使用 1 例,女,84 岁;离心时间对心肌损伤标志物检测的影响分析(以下简称离心时间的影响分析)使用 21 例,男 10 例,女 11 例,年龄 3~85 岁。所选患者心脏标志物水平涵盖低中高水平,且无脂血、黄疸、溶血。

1.2 仪器与试剂 使用强生公司 VITROS 5600 生化免疫分析仪及其配套试剂。cTnI 批号 2228,有效期至 2016 年 12 月 28 日;CK-MB 批号 1950,有效期至 2016 年 11 月 25 日;Myo 批号 1111,有效期至 2016 年 9 月 19 日;信号试剂批号 3798,有效期至 2016 年 9 月 27 日。水平离心机使用安徽中科中佳科学仪器有限公司的 SC-3614 型低速离心机。血清管为格雷那 5 mL 带分离胶管(批号 A15123KV),肝素锂抗凝管为浙江

^{*} 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81201349);江苏省南通市前沿与关键技术创新项目(MS22015049)。

作者简介:崔明,男,副主任技师,主要从事临床实验室管理方面的研究。 [△] 通信作者, E-mail: jrjr2020@163.com。

康是 5 mL 不含分离胶管(批号 160620),EDTA-K₂ 抗凝管为浙江康是 2 mL 血常规管(批号 160625)。

1.3 方法 3 类标本影响分析的患者被同时采集肝素锂抗凝、EDTA-K₂ 抗凝和血清标本各 1 管,然后一起离心后分离血浆或血清即时上机检测 cTnI、CK-MB、Myo 水平。EDTA-K₂ 干扰试验时,先在每根血常规管中加入 1 mL 蒸馏水(模拟 2 mL 规格血常规管中血浆量大约 1 mL),再将多管血常规管中的蒸馏水合并在一管中作为 EDTA-K₂ 提取液,接着将该提取液与蒸馏水依次按照 0:1、1:2、1:1、2:1、1:0 的比例进行稀释,然后将这些含有不同量 EDTA-K₂ 的稀释液依次与同 1 例检测 cTnI 的肝素锂抗凝血浆标本按照 9:1 的比例混合,最后上机检测 cTnI,每管重复检测 3 次。研究离心时间的影响分析时,将采集的肝素锂抗凝管标本先 4 000 r/min 离心 2 min,然后依次检测上层血浆的血小板计数和 cTnI、CK-MB、

Myo 水平,仪器取样后,再将抗凝标本 4 000 r/min 离心 8 min,第 2 次检测 cTnI、CK-MB、Myo。

1.4 统计学处理 所有数据分析和作图使用 SigmaPlot 11.0 统计软件。3 类标本影响分析和离心时间影响分析的检测数据均呈偏态分布,故前者的 3 组数据比较使用基于秩的 Kruskal-Wallis 单因素方差分析,后者的 2 组数据比较使用 Mann-Whitney 秩和检验。以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 3 类标本的影响分析 在进行 cTnI、CK-MB、Myo 的差值比分析时,以肝素锂抗凝标本检测值为参照值,计算血清组或 EDTA-K₂ 抗凝组的检测值与参照值的差值。结果显示,EDTA-K₂ 抗凝组的 cTnI 值比肝素锂抗凝组平均低 15.26%,差异有统计学意义($P<0.05$);血清组的 CK-MB 比肝素锂抗凝组平均高 7.51%,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

表 1 3 类标本的影响分析[M(P₂₅,P₇₅),n=28]

项目	肝素锂抗凝组	血清组	EDTA-K ₂ 抗凝组
cTnI(μg/L)	0.107(0.051,0.685)	0.115(0.056,0.693)	0.095(0.038,0.580)
CK-MB(μg/L)	2.350(1.500,6.250)	2.900(1.540,5.350)	2.600(1.450,4.800)
Myo(μg/L)	218.000(88.300,686.100)	204.200(87.100,493.300)	213.600(86.800,510.300)
与肝素锂抗凝组 cTnI 差值比(%)	—	4.560(−1.360,10.460)	−15.260(−30.190,−8.660)*
与肝素锂抗凝组 CK-MB 差值比(%)	—	7.510(−2.03,27.030)*	3.500(−8.330,12.000)
与肝素锂抗凝组 Myo 差值比(%)	—	−0.940(−6.000,0.840)	0.070(−4.300,4.500)

注:—表示无数据;* $P<0.05$ 。

2.2 EDTA-K₂ 干扰试验 EDTA-K₂ 稀释液 1~5 分别由 EDTA-K₂ 提取液与蒸馏水按 0:1、1:2、1:1、2:1、1:0 比例组成。以管 1 的 cTnI 检测均值为参照值,分别计算其余各管的 cTnI 检测均值与参照值的差值。结果发现,随着 EDTA-K₂ 水平的增加,cTnI 差值越来越大。见表 2。

2.3 离心时间的影响分析 肝素锂抗凝标本在 4 000 r/min 分别离心 2 和 10 min 后,进行检测结果的统计分析,cTnI、CK-MB、Myo 等指标 2 组间比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 3。

表 2 EDTA-K₂ 对 cTnI 检测的干扰

血常规管 编号	稀释液 编号	稀释比	cTnI ($\bar{x}\pm s,\mu\text{g/L}$)	cTnI 差值 (%)
1	1	1:9	0.473±0.006	0.00
2	2	1:9	0.450±0.015	−4.86
3	3	1:9	0.430±0.006	−9.09
4	4	1:9	0.418±0.003	−11.63
5	5	1:9	0.400±0.004	−15.43

表 3 2 种离心时间对 cTnI、CK-MB、Myo 的影响分析[M(P₂₅,P₇₅),μg/L]

离心转速(r/min)	离心时间(min)	n	cTnI	CK-MB	Myo
4 000	2	21	0.047(0.012,3.998)	1.30(0.45,7.95)	67.5(29.1,175.6)
4 000	10	21	0.044(0.012,4.041)	1.23(0.45,8.05)	69.0(29.3,180.9)
P			0.938	1.000	0.920

3 讨 论

虽然血清是检验科日常工作中使用量最大的标本类型,但在离心获取血清前需要耗时等待全血凝固,美国国家临床生物化学学会推荐使用抗凝血检测心肌损伤标志物以缩短 TAT^[3]。由于 EDTA-K₂ 抗凝血浆相对来说获取量偏少,因此检测时多选择肝素锂抗凝血浆。尽管如此,仪器与试剂厂家也认可 EDTA-K₂ 抗凝血浆和血清标本,但 3 类标本的检测结果间是否一致值得探讨。本研究发现,EDTA-K₂ 抗凝血浆的 CK-MB 和 Myo 检测值与肝素锂抗凝血浆相差不大,但 cTnI 检测值比肝素锂抗凝血浆平均低 15.26%,其后进行的 EDTA-K₂ 干扰试验也进一步证实了 EDTA-K₂ 存在负干扰性,即随着血浆中 EDTA-K₂ 水平的增多,负干扰也越来越大。这是由于 EDTA-K₂ 会螯合血浆中的 Ca²⁺,而后者对于心肌损伤时释放入血的 cTnI-cTnC 等复合物的稳定至关重要^[4-5]。陈孝红等^[6]、Eriksson 等^[7] 也研究发现 EDTA-K₂ 抗凝血浆的 cTnI 检测值比肝素锂抗凝血浆低,只是程度不一,这可能与各家使用的检测系统不同有关,各厂商使用的单克隆抗体对血中不同

形式和状态的 cTnI 敏感性可能存在一定的不同^[4,7]。实验室若使用 EDTA-K₂ 抗凝血浆,需另外制订相应的参考区间和诊断界值。强生公司配套试剂说明书告知,血清的 CK-MB 检测值比肝素锂或 EDTA-K₂ 抗凝血浆高,本研究结果证实了这点(平均高 7.51%)。Daves 等^[8] 研究发现,使用 Beckman Coulter Access 时,含分离胶血清管的 CK-MB 检测值比不含分离胶肝素锂抗凝管高,但 Hedberg 等^[9] 观察到 Abbott AxSYM 检测肝素锂血浆的 CK-MB 水平比血清高。这就要求各实验室在使用各自检测系统前需对厂家声明进行验证,并制订各自实验室的参考区间。

世界卫生组织的相关指南要求含抗凝剂的血浆管要在 3 340~4 096 r/min 下离心 15 min^[10],以获取乏细胞血浆,试管厂家也要求含抗凝剂的血浆管 3 173~3 507 r/min 离心 10~15 min。强生公司配套试剂说明书也告知,应彻底分离标本中的所有细胞成分,否则可能导致错误的试验结果。目前,本科室使用安徽中科中佳 SC-3614 型低速离心机 4 000 r/min 离心 10 min 以获取肝素锂抗凝血浆。鉴于临床相关指南对

TAT 的要求为不超过 1 h^[2],因此笔者进行了缩短离心时间的初步比较分析,发现 4 000 r/min 离心 2 min 后 cTnI、CK-MB、Myo 的检测值与离心 10 min 后的检测值差异无统计学意义 ($P>0.05$),而且这些微弱的差异也与离心 2 min 后血浆中残留的血小板数量无相关性。提示可以缩短离心时间以减少 TAT,更快地得出检测结果。Minder 等^[11]研究发现,3 490 r/min 离心 15 min、3 490 r/min 离心 10 min、3 234 r/min 离心 7 min 的离心条件下,cTnT、CK-MB、Myo 的检测结果一致。Holland 等^[12]也发现,3 260 r/min 离心 4 min 与 2 990 r/min 离心 10 min 的 cTn 检测结果没有差异。本研究对离心时间的影响进行了初步探讨,可能会由于样本量偏少而未能发现缩短离心时间可能造成的影响,今后还需进一步扩大样本量并探讨血脂等异常情况下,缩短离心时间是否会造成检测结果的差异。

总之,使用肝素锂抗凝血浆、4 000 r/min 离心 2 min 是实际工作中可考虑使用的标本预处理方案,它在降低临床检测质量的前提下,缩短了 TAT 并能使临床和患者受益。

参考文献

[1] 沈卫峰,张奇,张瑞岩. 2015 年急性 ST 段抬高型心肌梗死诊断和治疗指南解析[J]. 国际心血管病杂志,2015,42(4):217-219.

[2] 中华医学会心血管病学分会,中华医学会检验医学分会. 高敏感方法检测心肌肌钙蛋白临床应用中国专家共识(2014)[J]. 中华内科杂志,2015,54(10):899-904.

[3] Wu AH, Apple FS, Gibler WB, et al. National academy of clinical biochemistry standards of laboratory practice; recommendations for the use of cardiac markers in coronary artery diseases[J]. Clin Chem, 1999, 45(7):1104-1121.

[4] 杨亚东,陆汉魁,高云朝. 心肌肌钙蛋白 I 实验室检测和临床应用的相关问题[J]. 标记免疫分析与临床,2007,14

(3):192-196.

[5] Gerhard W, Nordin G, Herbert AK, et al. Troponin T and I assays show decreased concentrations in heparin plasma compared with serum; lower recoveries in early than in late phases of myocardial injury[J]. Clin Chem, 2000, 46(6 Pt 1):817-821.

[6] 陈孝红,杨红英,杨成凤,等. 抗凝剂在心肌肌钙蛋白 I 测定中的影响初探[J]. 检验医学与临床,2009,6(17):1457-1458.

[7] Eriksson S, Junikka M, Laitinen P, et al. Negative interference in cardiac troponin I immunoassays from a frequently occurring serum and plasma component[J]. Clin Chem, 2003, 49(7):1095-1104.

[8] Daves M, Trevisan D, Cemin R. Different collection tubes in cardiac biomarkers detection[J]. J Clin Lab Anal, 2008, 22(6):391-394.

[9] Hedberg P, Melkko T, Valkama J, et al. Higher CK-MB mass values in heparin plasma than in serum measured with the Abbott AxSYM system [J]. Clin Chem Lab Med, 2001, 39(9):872-874.

[10] World Health Organization, Guidelines. Use of anticoagulants in diagnostic laboratory investigations[Z], 2002.

[11] Minder EI, Schibli A, Mahrer D, et al. Effects of different centrifugation conditions on clinical chemistry and Immunology test results[J]. BMC Clin Pathol, 2011, 11(6):1-15.

[12] Holland LL, Dombourian M. Evaluation of an abbreviated centrifugation protocol for chemistry testing [J]. Lab Medicine, 2012, 43(3):78-81.

(收稿日期:2016-12-15 修回日期:2017-01-06)

(上接第 1048 页)

由于骨髓和造血细胞受损,老年人的造血功能减弱比青年人更显著。Cr 和 BUN 在不同年龄段间的差异有统计学意义 ($P<0.05$),但有研究指出^[7],由于生活方式、饮食习惯等原因,Cr 和 BUN 会随年龄增长而增加,故本研究中不同年龄段 Cr 和 BUN 差异不认为是由 HIV 感染引起。CD4⁺ 和 CD8⁺ 指标在青年组与中年组、青年组与老年组组间差异有统计学意义 ($P<0.05$),有研究发现^[8-9],年龄因素可以影响 CD8⁺ 细胞端粒长度和端粒酶的表达,但 CD4⁺ 细胞端粒在任何年龄都比较稳定,健康成年人不同年龄段的 CD4⁺ 细胞数无差异。HIV/AIDS 感染者中,青年组 CD4⁺ 细胞多于中年组和老年组,表明 HIV 感染后,中老年人体内 CD4⁺ 细胞受攻击后数量少于年轻人体内 CD4⁺ 细胞数。由于 CD8⁺ 细胞数量会随年龄发生变化,因此本研究中不同年龄段 CD8⁺ 细胞差异是否受 HIV 影响暂无定论。

综上所述,CD4⁺ 细胞作为检测 AIDS 的主要指标,结合 CD8⁺ 细胞数和 CD4⁺/CD8⁺ 值,具有一定的敏感性,对通过常规血液检查发现并辅助 AIDS 诊断具有重要意义,但是对于 AIDS 的定性诊断还是要依靠抗体诊断、抗原诊断和病毒载量试验等其他试验手段。不同年龄段 HIV/AIDS 感染者的 CD4⁺ 细胞数会存在差异,因此应设定不同年龄段 CD4⁺ 细胞数量参考范围,为在常规血液检测结果中发现并筛选 HIV/AIDS 感染者提供具体依据。

参考文献

[1] 胡翠莲,陈志军. 艾滋病患者血液检测指标分析[J]. 中国

中医药现代远程教育,2010,8(14):170-171.

[2] 王国蓉,李春来,方慧. 艾滋病的实验室诊断及治疗[J]. 西部医学,2006,18(1):86-87.

[3] 蒋卫民,潘孝彰,康来仪. CD4 淋巴细胞计数在 HIV 感染中的地位 and 重要性[J]. 中国艾滋病性病,2001,7(6):380-382.

[4] 关静,李峰,王健,等. 艾滋病患者免疫学指标、外周血组分与症状体征之间关系的回顾性研究[J]. 北京中医药大学学报,2007,30(6):423-426.

[5] 姚瑞霞. 艾滋病病毒实验室诊断方法及患者检测指标[J]. 哈尔滨医药,2005,25(1):49-50.

[6] 朱建民,孙杨,胡亚红,等. 全国各区域血红蛋白正常参考值差异性分析[J]. 现代检验医学杂志,2012,27(4):58-61.

[7] 陈东红. 40 岁以上不同年龄段血糖和血脂肌酐和尿酸的变化特点[J]. 吉林医学,2010,31(18):2886.

[8] Son NH, Murray S, Yanovski J, et al. Lineage-specific telomere shortening and unaltered capacity for telomerase expression in human T and B lymphocytes with age[J]. J Immunol, 2000, 165(3):1191-1196.

[9] 蒋卫民,潘孝彰,康来仪,等. 上海地区成人不同年龄组间 CD4、CD8 淋巴细胞计数正常值调查[J]. 中华传染病杂志,2002,20(4):203-205.

(收稿日期:2016-11-25 修回日期:2017-01-16)