

DOI:10.13602/j.cnki.jcls.2020.10.14

生化检测系统携带污染的分析与处理策略*

莫云钧, 覃俊龙, 张秀明(深圳市罗湖区人民医院医学检验科, 广东深圳 518001)

摘要: 试剂成分、反应产物、反应条件以及分析系统各组件部分是生化配套检测系统和开放系统发生携带污染的来源和途径。配套系统从如试剂配方的污染源头进行设计、控制, 并提高仪器的清洗能力, 经过全遍历评估以及交叉污染规避设置, 可有效切断携带污染。借鉴配套检测系统解决携带污染的方法, 为生化开放系统解决携带污染提供策略。生化分析系统交叉污染来源多, 污染途径复杂, 保持检测系统的完整性是避免交叉污染的有效手段, 是检测系统有效性的基本保证。

关键词: 配套检测系统; 开放系统; 携带污染; 处理策略

中图分类号: R446

文献标志码: A

生化检测系统是指生化分析仪、校准品、试剂和检验程序的组合。国外实验室多采用配套检测系统, 即生化分析仪、校准品、试剂和检验程序形成固定组合并经 FDA 批准的检测系统, 检测患者标本; 国内使用配套检测系统的实验室虽逐年增加, 但出于成本控制等原因仍有不少实验室在生化分析仪上根据各自实验室意愿选择校准品、试剂和检验程序组成开放系统。经 FDA 批准的配套检测系统厂商都有严格的控制携带污染措施, 并进行了全遍历交叉污染评估(注: 全遍历, traversal, 是指沿着某条搜索路线, 依次对树或图中每个节点均做一次访问, 本文是指沿着可能发生交叉污染的路径节点进行评估分析), 能有效控制项目之间的携带污染。但开放系统或在配套检测系统上增加新的检验项目, 实验室很难进行项目间的全遍历交叉污染评估, 项目间的携带污染难以达到有效控制^[1]。此外, 测试项目增多、仪器设计中加样量的减少、各类体液样品的应用、不同抗凝剂的使用等都可能使样品携带污染发生新的变化^[2]; 国内部分实验室未按照制造商建议进行有效的预防性维护, 甚至为了降低成本, 造成主要元件超寿命使用, 也是自动生化分析仪携带污染存在或增加的重要原因。因此, 控制携带污染仍然是现阶段提高生化分析系统检测结果准确性的重要任务。

1 携带污染的定义

携带污染(carry-over 或 carryover)是指由测量系统将一个检测样品反应携带到另一个检测样品反应的分析物不连续量, 由此错误地影响了另一个检测样品的表现量。某一生化检测从加样开始至反应结束、清洗完成的任意过程中残留的任一物质(可以为生物样品, 也可以为试剂或混合反应液)通过仪器硬件(包括但不限于试剂针、样品针、反应杯、搅拌杆、管路等)被携带到下一个生化检测反应中, 参与反应和/或影响反应进程, 并导致检测结果显著偏差的过程。生化分析仪的携带污染不可能完全避免, 只有当反应残留物对下一个反应结果的影响超过实验室预设的分析质量标准或影响患者临床结局时, 才被定义为携带污染, 需要采取必要的措施。当携带污染发生在 2 个特定的检测项目(试剂)之间时, 也被称交叉污染(cross contamination)。

2 携带污染的来源

2.1 试剂成分间的直接影响 前一个测定试剂中直接含有后一个测试试剂所要测定的项目^[3-5], 如: 淀粉酶(Amy)试剂 1(R1)中含有酶活化剂钙离子(Ca²⁺), 当某样品检测 Amy 和 Ca²⁺时, 顺序是先 Amy 后 Ca²⁺。因吸取过 Amy 的 R1 试剂针上可能沾有残留的 R1 试剂, 当 R1 试剂针再吸取 Ca²⁺试剂时, 会引入 Amy 的 R1 试剂中含有的 Ca²⁺, 这样对 Ca²⁺的检测结果可能造成正误差。

常见试剂成分间的直接影响有: (1) 葡萄糖(Glu, 葡萄糖氧化酶法)、总蛋白(TP)与酸性磷酸酶(ACP)试剂中含有较高浓度的钾离子(K⁺); (2) 胆碱酯酶(ChE)、总胆固醇(TC)、Glu(葡萄糖氧化酶法)、尿酸(UA, enzymatic colorimetric 法)、乳酸脱氢酶(LDH, IFCC 法)、 α -羟丁酸脱氢酶(HBDH, DGKC 法)等试剂中含有磷酸盐缓冲液; (3) TC、三酰甘油(TG)试剂及高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)试剂中含有胆酸钠; (4) 丙氨酸氨基转移酶(ALT, IFCC 法)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST, IFCC 法)试剂中含有高活性的 LDH。以上试剂的成分分别会对 K⁺(Uv-enzymatic 法)、磷(P)、总胆汁酸(TBA)及 LDH 的测定结果形成干扰, 造成交叉污染。(注: 由国际临床化学家联合会推荐的一些检测方法简称 IFCC 法, 由德国临床化学学会制定并推荐的一些检测方法简称 DGKC 法)。

2.2 试剂成分间的间接影响 试剂成分参与反应, 上一个试剂中含有的某种试剂成分与下一反应所要测定的底物相互作用, 因而干扰下一反应的测定结果^[3-4]。例如: 镁离子(Mg²⁺)测定试剂的络合剂也能与铁离子(Fe²⁺)结合, 影响 Fe²⁺与铁络合剂的结合; 直接胆红素(D-Bil)重氮法试剂与 Mg²⁺试剂中含有乙二胺四乙酸(EDTA), 均能与 Ca²⁺结合, 从而影响 Ca²⁺的测定; 以甘油作为酶保护剂的试剂, 会对三酰甘油(TG)的测定带来干扰; Ca²⁺(甲基百里香酚蓝法)试剂对 K⁺有负干扰; TC 试剂中含有胆固醇酯酶, 可水解胆固醇酯形成游离胆固醇, 对游离胆固醇测定造成干扰。

2.3 反应产物的影响 上一个试剂所引导的反应对下一个项目的反应进程带来间接的干扰, 下一项目所测定的是前后 2 个项目反应的综合作用结果。当上一反应产物为 H₂O₂

* 基金项目: 广东省深圳市医疗卫生三名工程项目(SZSM201601062); 深圳市医学重点学科(SZXK054)。

作者简介: 莫云钧, 1991 年生, 技师, 硕士, 主要从事临床生化工作。

通信作者: 张秀明, 主任技师, E-mail: zxm0760@163.com。

时,则对以 Trinder 反应产生颜色的测定结果造成干扰,如 UA 对 TC 结果的影响,TC 对肌酐(Cr,酶法)测定结果的影响,Glu(葡萄糖氧化酶法)对 Cr 测定结果的影响。肌酸激酶(CK,N-乙酰-L-半胱氨酸法)、肌酸激酶同工酶(CK-MB,N-乙酰-L-半胱氨酸法)试剂中含有 Glu 成分,其分析方法的原理中包含 Glu 的己糖激酶(HK)反应过程,因此可能对 Glu 的测定带来干扰,尤其对 Glu 的 HK 法测定可能带来严重干扰。

2.4 影响反应条件 上一试剂缓冲液成分改变了下一反应的 pH 环境,从而改变反应速率。例如:TP(双缩脲法)测定需在 pH 8~9 时,蛋白质肽键才能与碱性铜溶液作用生成紫色反应,若 pH<8,则会导致 TP 结果偏低,还直接影响球蛋白、清蛋白/球蛋白结果;酶活性测定有最适 pH,大多数酶反应 pH 在 6.0~7.5 之间,碱性磷酸酶(ALP)、 γ -谷氨酰基转移酶(GGT)、LDH 则在碱性条件下最适宜;Cr(苦味酸速率法)反应条件为碱性,果糖胺(动力学法)反应条件为酸性,受到污染后反应速率会减慢。Cr(酶法)试剂中含有抗坏血酸氧化酶,影响了氧化还原反应的进程,会对 TBA(酶循环法)测定结果有影响;D-Bil(钒酸盐氧化法)试剂中的酒石酸盐缓冲液会影响 ALT 活性,对测定结果有负干扰。

3 携带污染的途径

3.1 试剂针污染 全自动生化分析仪一般都采用双试剂针,即所有项目的第一试剂都共用试剂针 R1,所有项目的第二试剂都共用试剂针 R2。试剂针 R1 或 R2 在每吸取一次试剂后都会清洗一次,之后会立即吸取下一个项目的试剂。如果仪器清洗能力下降或没有定期进行维护,试剂针在吸取试剂时会将部分残留的前一项目试剂成分带入到后一项目反应杯中,对后一项目检测结果造成影响。从各个项目设置的参数可知,试剂体积量远大于样品体积量,因此试剂针携带污染影响程度会高于样品针携带污染。

3.2 搅拌棒污染 试剂与样品、第一试剂与第二试剂的混匀需要搅拌棒,而搅拌棒如果清洗不完全或粘附力增加时,残留试剂可能会对下一检测结果造成影响。

3.3 比色杯污染 生化分析仪的比色杯大体分为 2 种,一种是循环使用的(如石英比色杯等),另一种是需要定期更换的(如塑料比色杯等),每个比色杯检测完毕并自动清洗后,继续下一个检测项目的检测。当由于各种原因导致某个比色杯清洗不完全或该比色杯老化时,吸附在比色杯上的上一个项目的残留试剂或者反应物可能会对在该比色杯中进行的下一个项目的检测结果造成影响。根据经验,比色杯的污染对结果影响最大,因为比色杯最难以清洗干净,且在实际工作中难以判断在该比色杯中检测的前后测试项目。

3.4 样品针污染 目前大多数全自动生化分析仪采用注射器或定量泵产生负压,通过样品针吸取样品,吸样后通过一定压力的清洗液清洁样品针。当样品针在清洗不完全或粘附力增加时,样品残留可能会对下一相邻样品的检测结果造成影响。

3.5 清洗系统 目前大多数全自动生化分析仪采用多阶清洗剂和水清洁比色杯,当清洗针或干燥针上有试剂、样品或反应物残留,可能会对下一个被清洗比色杯的测定结果造成影响,一般来说清洗系统带来的携带污染很少,可以忽略。

4 配套检测系统解决携带污染之道

4.1 从机理上尽可能去除污染源 TC 试剂配方中一般含有一种物料(具有提高试剂稳定性和抗脂血干扰的作用),是 TBA 的检测底物;而 TBA 是循环酶法试剂,可将底物信号循环放大(图 1),因此只要有微量的底物残留,就会对结果产生很大影响,并且从反应曲线上无法看出是否存在污染。深圳迈瑞公司的 TC 项目试剂盒,通过优化配方,从根本上解决了交叉污染问题。

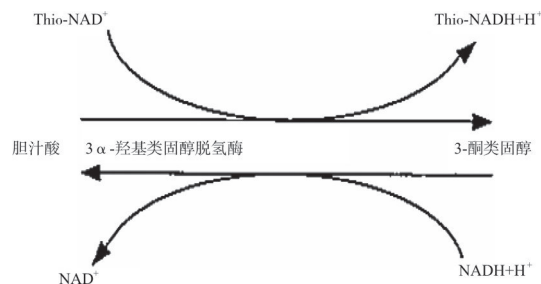


图 1 TBA 检测原理示意图

4.2 提高仪器清洗能力阻断污染之路 从仪器系统设计到关键器部件设计再到清洗时序设计,步步精细化控制交叉污染,如图 2。不同清洗水温度对试剂针携带污染的影响不同,随着清洗水温度增高,携带污染物残留体积会降低,且对新旧试剂针的影响程度不同。

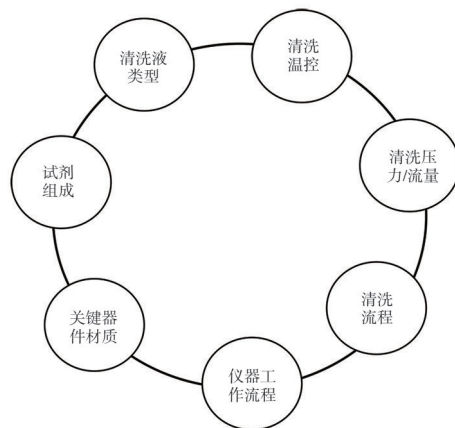


图 2 生化分析系统清洗流程

4.3 完整的项目全遍历交叉污染评估 在构建配套检测系统时,要对所有开展的项目进行全遍历交叉污染筛查,在理论分析的指导下,使用添加法做覆盖性筛选,再全遍历实测,一般取偏差<5%,或<1.6 个标准差(SD)作为指标,也可以参考临床指标^[6]。这是一项系统性的工作,通常在新检测系统构建、增加新试剂、仪器试剂变更等情况下进行。

交叉污染评估中 SD 的含义与指标定义:评价项目间的交叉污染时,评估被污染项目的浓度一般取该项目的医学决定水平的最低浓度点左右的值作为测试浓度(譬如,ALT 医学决定水平为 20 U/L、60 U/L、300 U/L,那么评估交叉污染选取样品浓度为 20 U/L 左右),污染源项目则取该项目的线性上限浓度值。评估项目交叉污染时的 SD 选取被污染项目基准浓度的批内精密度的 SD(譬如,ALT 为被污染项目,那么 20 U/L 左右的浓度值测量 10 次或 20 次,计算 SD),指标取 1.6 SD。因 Westgard 质控规则一般取 2 SD 作为评判结果是否失控的警告限或离群标准,选取 2 SD 的 80% 作为评估标

准,即当被污染结果小于 1.6 SD,认为结果与正确值无显著偏差;我们取偏差小于 5%或小于 1.6 SD,这个指标比较严格,一般评估交叉污染的文献上取 10%作为可接受指标^[1]。

生化分析系统中其他试剂对镁离子检测的携带污染较难控制。各品牌生化仪为降低携带污染对镁离子测定的影响,设计了多种控制方法。例如:罗氏 Cobas c701 设有 12 组镁离子试剂针污染对,贝克曼同时设有试剂针和搅拌杆的镁离子污染对;迈瑞 BS-2000M 机型通过提升仪器清洗试剂针、搅拌杆和反应杯的能力,将试剂针、搅拌杆和反应杯对镁离子的总系统污染率控制在 0.04 mmol/L 以下,见图 3。

4.4 仪器防交叉污染功能设计与测试流程优化 仪器强大的防交叉污染功能可以有效避免项目间交叉污染的发生。在同一样品内,测试项目根据项目间污染的情况优化测试顺序;在不同样品间,则可通过设置强化清洗,并且根据项目污

染的特性,智能选择酸、碱或去离子水作为清洗剂。罗氏 Cobas c701 交叉污染对设置以及清洗剂选择情况示例见表 1,迈瑞 BS-2000M 交叉污染对设置以及清洗剂选择情况示例见表 2。

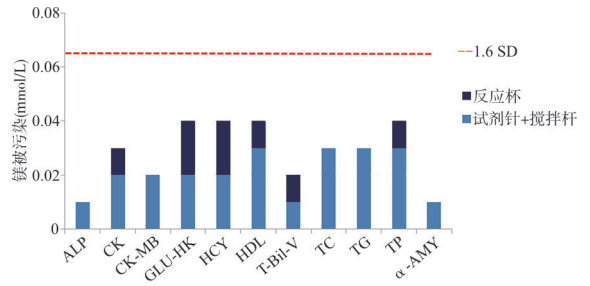


图 3 BS-2000M 生化分析系统镁被污染的评估

表 1 罗氏 Cobas C501 交叉污染对设置以及清洗剂选择情况(示例)

试剂针	污染源项目	污染源途径类型	被污染项目	污染途径类型	清洗液类型	清洗液使用量(μL)
1	AMIK2	R1	ALBT2	R1	D1	180
1	AMPS2	R1	GGT2	R1	D2	110
1	BILT3	R1	STFR	R1	D1	140
1	BILT3	R1	B2MG	R1	D1	140
1	CARB2	R1	GGT2	R1	D2	120
1	CHOL2	R1	CREP2	R1	D2	180
2	CKL	R2	AECT2	R2	D1	80

注:AMIK2,阿米卡星;AMPS2,苯丙胺;BILT3,总胆红素;CARB2,卡马西平;CHOL2,胆固醇;CKL,肌酸激酶;ALBT2,微量清蛋白;GGT2,γ谷氨酰转氨酶;STFR,可溶性转铁蛋白受体;B2MG,β2 微球蛋白;CREP2,肌酐酶法;AECT2,乙酰胺基酚;R1,试剂 1;R2,试剂 2;D1,碱性洗液 NAOHD;D2,酸性洗液 SMS。

表 2 迈瑞 BS-2000M 交叉污染对设置以及清洗剂选择情况(示例)

污染源项目	污染源途径类型	被污染项目	清洗液类型	清洗次数
HCY II	R1	ADA	DB	1
FUN	R1	CHE	DA	1
FUN	R1	CRP	DA	3
UIBC	R1	Fe	Water	1
FUN	R1	Glu-H	Water	1
FUN	R1	PA	DA	1
CREA-J	R1	RF II	DB	1
LIP	R1	TBA	DB	2

注:HCY II,同型半胱氨酸-酶循环法;FUN,果糖胺;UIBC,不饱和铁结合力;CREA-J,肌酐-改良 Jaff 法;LIP,脂肪酶;ADA,腺苷脱氨酶;CHE,胆碱酯酶;CRP,C-反应蛋白;Fe,铁;Glu-H,葡萄糖-己糖激酶法;PA,前清蛋白;RF II,类风湿因子;TBA,总胆汁酸;R1,试剂 1;R2,试剂 2;DB,碱性洗液;DA,酸性洗液。

5 开放系统携带污染分析策略

5.1 开放系统所面临的携带污染问题 自建系统所用试剂来源于不同厂家,试剂污染源成份复杂,通过试剂说明书很难判定试剂项目间是否存在污染,往往只能靠经验以及样品检测过程中的结果异常去发现项目间交叉污染并进行规避设置。检测系统投入使用前,完整地 go 遍历所有开展项目间的交叉污染,工作量大,而且往往需要检验人员对仪器的工作流程十分了解。使用过程中增、减项目,又会改变项目的测试顺序,也有可能带来新的交叉污染。

5.2 开放系统携带污分析策略 根据《生化分析仪携带污染的分析评估及处理方法专家共识》^[7],试剂携带污染分析思路如下:收集现有的项目交叉污染的资料,包括但不限于制造商手册、制造商通告、文献等,寻找被污染项目可能受哪

些项目的试剂污染;研究被污染项目所在的检测单元的试剂分布、检测程序,是否存在已知的“配对”交叉污染;分析被污染项目使用相同试剂针、搅拌杆、冲洗头、比色杯等仪器原件,紧邻的前一个项目是何项目,分析是否存在污染的可能;如已有的资料信息和结果信息无法提示到底被哪一个项目的试剂污染,则可以设计试验评估与被污染项目处于相同检测单元中的所有其他项目试剂是否发生携带污染。

5.3 开放系统交叉污染评价方案 以雅培公司 Abbott Architect c8000 临床生化分析仪对 32 个生化项目的交叉污染评估为例^[8],实验方案设计见表 3,通过仪器设定生理盐水检测项目,并重复进行生理盐水检测,以达到清洁试剂针的目的。后续测定被污染项目的基础值,执行清洁试剂针后再分别测定污染源项目、被污染项目。实验室结果显示以下项目配对之间不存在交叉污染:Glu-Fe²⁺, Fe²⁺-Glu;Hb-ALT,

ALT-Hb; ChE-Urea, Urea-ChE; C4-Cr, Cr-C4; 锂-TC, TC-锂; Fe^{2+} -Hb, Hb- Fe^{2+} 。以下项目配对之间存在交叉污染(携带污染率%): 铁蛋白-ALP(-10.7%), 铁蛋白-CK(-10.5%), 铁蛋白- Fe^{2+} (-10.7%), CRP-IgM(-15.8%),

ChE-BILT3(+15.4%), 乳酸-铁蛋白(-22.9%), 尿素- Fe^{2+} (-10.8%), HDL-二氧化碳(-7.2%), IgA-二氧化碳(-35.4%)。实验室通过设置额外的水、酸或者碱清洗后,试剂间的交叉污染满足要求。

表 3 交叉污染评估实验方案设计

顺序	样品	试验项目	重复测量次数	目的	计算
1	盐水	盐水	5	清洗试剂针	不需要
2	对照	被污染项目	5	未被污染时的测量基础值	被污染前 5 次测量值的均值
3	盐水	盐水	5	清洗试剂针	不需要
4	对照	污染源项目	5	可能的污染源项目测量	不需要
5	对照	被污染项目	5	被污染后测量值	污染率(%) = [(被污染后第 1 次测量值-基础值)/基础值] × 100%

6 交叉污染案例分析

某患者曾出现左脚大脚趾关节红肿及剧烈疼痛,怀疑痛风,随即到本院检查。与导医沟通后,得知症状可能是痛风也可能是风湿免疫系统疾病。在肾内科就诊后,心存疑虑的患者又就诊于风湿免疫科,由于该患者当时未开通一卡通,患者拿着 2 个科室主诊医生开具的两份检测申请又分别在 2 个不同的采血窗口进行了采血登记,于是该患者同时有了 2 份检测结果,标本 1 UA 647 $\mu\text{mol/L}$,标本 2 UA 299 $\mu\text{mol/L}$,2 份标本结果差距巨大,于是实验室对 2 个不同的测试结果进行验证。(1)重测 2 份标本,标本 1 重测结果 644 $\mu\text{mol/L}$,标本 2 重测结果升高至 660 $\mu\text{mol/L}$;(2)标本 2(UA 299 $\mu\text{mol/L}$) 在科室另外一台仪器上重测,结果 652 $\mu\text{mol/L}$;(3)重测部分其他患者 UA 标本,重测结果与第一次测试结果没有明显偏差。实验室判断标本 2 第一次测试结果不正确。实验室查看 2 个标本的反应曲线,发现标本 2 反应监测点 13 点后出现了一个明显的负向反应,标本 1 没有,显然这个反应受到了干扰。检查试剂、质控结果均正常,其他标本测试结果正常,因此怀疑在检测过程中发生了携带污染。

引起携带污染的原因可能为搅拌棒、试剂针、比色杯以及样品针等残留前一个项目的物质,对下一个测试项目造成了干扰。首先怀疑试剂针的携带污染,查阅仪器检测记录,可见受干扰的 UA 测试前进行了低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)及 ChE 测试。实验室的生化分析仪有 2 个测试单元,LDL-C 测试被安排在 2 号测试单元,而 UA 和 ChE 同在 1 号测试单元,可见测试单元 1 发生了 ChE 对 UA 的交叉污染。实验室进一步做了交叉污染确认试验验证,随机选择了 2 个测试标本,每个标本分成 4 管,2 个标本的测试设置均为先进行一个 ChE 测试,再按管 1~4 进行 4 次尿酸测试,结果见表 4。验证结果显示 ChE 对尿酸检测存在明显的负干扰。实验室将 UA 和 ChE 分开放置,一个放置于内圈,一个放置于外圈,使用不同的试剂针加样,有效避免了 2 个项目之间的交叉污染。

表 4 尿酸交叉污染验证试验结果

测试顺序	样品 1	样品 2
ChE	8.717 U/L	8.819 U/L
UA(1)	131.4 $\mu\text{mol/L}$	121.5 $\mu\text{mol/L}$
UA(2)	355.8 $\mu\text{mol/L}$	356.4 $\mu\text{mol/L}$
UA(3)	365.8 $\mu\text{mol/L}$	365.7 $\mu\text{mol/L}$
UA(4)	367.4 $\mu\text{mol/L}$	367.7 $\mu\text{mol/L}$

7 小结

生化分析系统交叉污染来源多,途径复杂,分析中往往不易察觉^[9]。配套系统能从污染源头如试剂配方进行设计、控制,提高仪器的清洗能力从而切断污染途径,并经过全遍历评估以及对交叉污染规避设置,确保项目间不产生交叉污染。开放系统需要使用者自行验证哪些项目间存在交叉污染,工作量大,且增减项目会造成交叉污染,很难完全控制。保持检测系统的完整性是避免交叉污染的有效手段,是检测系统有效性的基本保证。

8 参考文献

- [1] Kyle P. Beware of carryover in modern chemistry analyzers[J]. Clin Chem Lab Med, 2010, 48(4): 519-521.
- [2] 于嘉屏. 全自动生化分析仪及其试剂间化学污染对检测结果的影响[J]. 中华检验医学杂志, 2007, 30(11): 1301-1302.
- [3] 王加, 张世昌, 张炳峰. 三酰甘油试剂携带污染对血清镁测定的干扰[J]. 临床检验杂志, 2018, 36(3): 171-172.
- [4] 余书武, 王霞. 生化试剂污染对全自动生化分析仪检测结果的影响分析[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(24): 137-138.
- [5] 陈谦, 唐宏. 生化试剂交叉污染对全自动生化分析仪检测结果的影响分析[J]. 中国卫生产业, 2019, 16(8): 178-179.
- [6] 孙会军, 韩奎, 聂逢兵. 关于 Beckman AU680 生化仪交叉污染评价及处理方案探讨[J]. 医学检验与临床, 2017, 28(7): 36-38.
- [7] 中华医学会检验医学分会临床化学学组. 生化分析仪携带污染的分析评估及处理方法专家共识[J]. 中华检验医学杂志, 2020, 43(7): 712-717.
- [8] Boneno J, Fokakis M, Armbruster D, et al. Reagent carryover studies: preventing analytical error with open clinical chemistry systems[J]. Lab Med, 2005, 36(11): 705-710.
- [9] Kavsak P, Zeidler J. Carryover: More than just a major hangover for the clinical laboratory[J]. Clin Biochem, 2016, 40(11): 735-736.

(收稿日期:2020-07-30)

(本文编辑:王海燕)