维普资讯 http://www.cqvip.com

胶乳凝集法测定尿中微量血红蛋白的探讨

检验系实验诊断教研室 罗春丽 陈宏础 蔡晓钟

提 要 报道了胶乳凝集试验测定尿中微量血红蛋白的方法。抗原用人红细胞分离出HbA，免疫家兔，获得特异性抗体致敏在胶乳上，结果表明，尿中微量血红蛋白最低检出量为150ng/ml，与日本伊藤氏报道基本一致。试验采用玻片凝集，5分钟内即可得出结果。本法简便，快速、敏感、特异、有利于临床开展，也可作为尿液分析仪检测的一个补充。文中还对假阳性，假阴性的问题进行了探讨。

关键词 血红蛋白尿；胶乳凝集反应
中图分类号 R446.122

血红蛋白(Hemoglobin,Hb)是红细胞的主要成分。成人血红蛋白主要为HbA。目前尿中微量Hb检测不论是试带(尿分析仪)或是常规法都是利用了Hb有类似过氧化物酶作用的原理[1]，故影响因素多，特异性较差。为此，我们进行了免疫法检测尿中微量Hb的研究，现将结果报道如下：

材料与方法

1. 仪器和试剂
   (1)日本岛津紫外分光光度计uv－265型
   (2)日本樱花低温离心机
   (3)聚苯乙烯胶乳颗粒
   (4)Sephadex G200
   (5)DEAE52
2. 方法
   (1)人Hb抗原的提取及纯化[1,2]：取正常人"O"型血40ml于保养液中，用2500rPm离心15min，弃去血浆及白细胞等，用生理盐水洗涤红细胞三次，加入红细胞比积二倍量的0.06mol PH8.6巴比妥缓冲液混匀，－20℃过液，取出后置室温融解，离心，收集上清液，生理盐水透析过液。过Sephadex G200离子交换柱，用0.1mol/L pH7.4Tris－Hcl洗脱收集Hb峰，即为纯化的HbA，经醋纤膜电泳鉴定为一条Hb带，分装，－20℃保存。

   (2)兔抗人Hb特异性抗体的制备，纯化及致敏：选择健壮雄性兔，体重1.5kg左右，第一次加福氏完全佐剂，Hb量10mg/kg，背部多点注射，以后每隔一周以相同量Hb与不完全佐剂悬液重复背部多点注射共六次，测得血清抗体效价为1:64(对流电泳法)。用盐析法[3]初步分离兔血清中IgG的粗制品，透析脱盐，经DEAE52纤维素离子交换层析纯化，获得兔抗人Hb抗体精制品。将15%胶乳颗粒用GBS(pH8.2甘氨酸缓冲盐水，含1g/L牛血清白蛋白)作1:15稀释，加兔抗人Hb抗体充分混匀，使其浓度为2mg/ml,37℃水浴45min,以5000rpm离心20min,再用GBS洗涤沉淀胶乳二次，最后用GBS恢复到原来胶乳体积，分装，4℃保存。

   (3)胶乳凝集试验测尿中微量血红蛋白方法：
   标本处理：先将0.5g/ml EDTA与尿液1:1混合，再将混合液加入适量的阳离子树脂充分混匀，取上清液备用。
   测定方法：在玻片上加一滴经处理的待检尿标本，再加1滴兔抗人Hb抗体致敏的胶乳，轻轻摇动玻片，使均匀混合，5min内观察结果生理盐水为对照，5min内出现凝集为阳性，根据凝集程度强弱记录＋，＋＋。
   ＋：大部分呈细颗粒状凝集
   ＋＋：全部呈粗状凝集

维普资讯 http://www.cqvip.com

结　果

1　致敏抗体浓度选择　以1、2、3、4、8mg/ml浓度抗体致敏胶乳，检测试带法阳性标本，结果表明2mg/ml抗体致敏适宜。

2　灵敏度试验　取人血20ml制成Hb液，HicN法测定其浓度，用正常小便将其稀释成不同浓度，结果表明，本法测得尿中Hb最低检测量为150ng/ml。

3　特异性试验

(1)与常见动物血进行交叉反应：将猪，羊、鸡、鸭、兔、鳝鱼血同样用上法处理制成Hb液将六种动物血及人Hb液分别进行琼扩及胶乳试验，并以试带法，常规法(无色孔雀绿法)对照结果见表1

表1　人及六种动物血与不同方法检测微量Hb结果比较

标　本	琼扩法	胶乳法	试带法	常规法(无色孔雀绿)
人Hb液	+	+	+	+
六种动物Hb液	−	−	+	+

(2)维生素C(Vitc)干扰试验：将试带法测得尿Hb为＋、＋＋、＋＋＋的标本，分别加入不同浓度的Vitc结果见表2：

表2　Vitc对胶乳凝集试验检测Hb的影响

标本号	方法	Vitc浓度mg/dl				
		200	100	50	25	0
1	胶乳法	+	+	+	+	+
	试带法	−	−	−	−	+
2	胶乳法	+	+	+	+	+
	试带法	−	−	−	−	++
3	胶乳法	++	++	++	++	++
	试带法	−	−	−	−	+++

4　中和试验　用锐检有红细胞，无结晶，试带法及胶乳法均为阳性的5份尿标本分别用蒸馏水作1：2，1：4，1：8，1：16，1：32稀释，取稀释后的标本0.1ml与0.1ml 10mg/ml兔抗人Hb抗体混合，37℃水浴1小时，离心取上清液，将不同浓度的中和前后的尿标本分别作胶乳试验，结果见表3：

表3　中和试验结果

标　本	1：2	1：4	1：8	1：16	1：32
1、中和前	++	+	+	+	+
中和后	+	−	−	−	−
2、中和前	++	++	+	+	+
中和后	+	+	−	−	−
3、中和前	+	+	+	−	−
中和后	−	−	−	−	−
4、中和前	++	+	+	+	+
中和后	+	−	−	−	−
5、中和前	+	+	−	−	−
中和后	−	−	−	−	−

中和试验后凝集程度均较中和试验前减弱2个滴度以上，证实这5份标本为真阳性。

5．尿内结晶干扰及消除　用0.25g/ml K_2HPO_4及含有尿酸钠，草酸钙、尿酸盐结晶的尿液进行胶乳试验，均出现不同程度的阳性，经中和试验证明为阴性，说明有盐类干扰，我们采取0.25g/ml EDTA及阳离子树脂先后处理标本后再做胶乳试验，结果见表4

表4　EDTA阳离子树脂处理标本后胶乳试验结果

标本	1△	2△	3△△	4*	5*	6*	7**	8**	9**	10**
处理前	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+
处理后	−	−	−	−	−	+	−	−	+	+

注：△0.25g/ml K_2HPO_4　△△尿酸钠结晶
* 草酸钙结晶　** 尿酸盐结晶

标本6、9、10经处理后仍为阳性，为进一步证实是假阳性或真阳性，我们作了中和试验，证实这三份标本为真阳性。

6、初步临床应用

(1)本法与试带法(尿分析仪)178例对尿微量Hb检测结果比较见表5

维普资讯 http://www.cqvip.com

表5 本法与试带法178例对尿微量Hb检测结果比较

		胶乳法		符合(%)
		阳性	阴性	
试带法	阳性($n=33$)	31	2	阳性93.9
	阴性($n=145$)	14	131	阴性90.0

(2)本法与未离心尿镜检红细胞的关系：将178例晨尿标本混匀，涂片(未离心)镜检10个视野记录红细胞个数，同时用胶乳法测定，结果见表6

表6 本法与未离心尿镜检红细胞178例关系

本法	未离心尿镜检红细胞个数/HP			
	0	1-2	2-5	>5
阴性($n=133$)	131	0	0	2
阳性($n=45$)	22	5	7	11

讨 论

1.尿中微量Hb测定目前常用试带法及常规法(无色孔雀绿，还原酚酞等)这些方法都是利用了Hb有类似过氧化物酶作用的原理，故易受饮食和药物影响而出现假阳性和假阴性，且灵敏度低。近几年来，国内外学者都在努力探寻一种特异、敏感、简便诊断粪便隐血的方法，国内已有报道用反向间接凝集法[3] 斑点法[4] 检测大便隐血，而国内尚未见到用免疫法测尿中微量Hb报道，为此我们进行了这方面的研究，建立了胶乳凝集测定尿中微量Hb的方法。据介绍试带法灵敏度为300ng/ml，高于常规法，而本法Hb的最低检出量为150ng/ml，与日本伊腾氏[5]报道的灵敏度120ng/ml基本一致。实验结果还表明，本法不受食物(动物血)及药物(Vitc)的影响，操作简便，快速、不需任何设备，便于一般基层单位推广。

2.由于尿分析仪的不断普及，尿微量Hb检测已成为常规检查项目，因此我们用本法与尿分析仪(试带法)进行了比较，结果表明，本法阳性率高于试带法，分析原因：①胶乳法灵敏度高于试带法。②VitC可抑制试带反应。③试带放置过久或保管不当出现假阴性。胶乳法无疑是试带法的一个必要的补充。

3.由于目前临床工作中大多采用未离心尿作镜检，故我们采用了未离心尿与本法比较，结果发现，尿微量Hb与未离心尿镜检红细胞结果并非完全一致，178例标本中22例镜检未见红细胞而本法阳性，其原因可能是：①未离心尿镜检时漏检，根据赵国瑞报告[6]，离心沉渣作镜检23%男尿和13%女尿中可见红细胞，而未离心原尿中只有9%男尿及4%女尿可见0—1红细胞。这也提示尿沉渣检查应采用离心沉淀后镜检。②尿中红细胞受渗透压，pH影响而自行破裂。③本法灵敏度高。本法也出现2例假阴性，这两例红细胞均为满视野，估计是细胞太多，抑制了抗原抗体结合亿所致，或者也可能是前带反应。尽管如此，我们认为，本法与未离心尿镜检红细胞方法比较更能反映患者尿中血红蛋白的真实情况。

参 考 文 献

1 李涤生，主编.临床检验基础第二版.北京人卫出版1989;222
2 王希良，等.中国实验临床免疫学1990 2(1)：22
3 武建国，主编.实用临床免疫学第一版，江苏科技出版社19;15
4 沈德均，等.浙江医大学报1992;21(1)：14
5 伊腾善夕.日本临床检查1992;36(9)：969
6 赵国瑞，等.中华医学检验杂志1984;7(1)：437

(收稿日期 1994-01-20)

(下转132页)