

3 种常用溶液配制 ABO 反定型红细胞的探讨

万 芳,黎卓华,陈 恒,崔敏涛(广东同江医院检验科,广东佛山 528300)

【摘要】 目的 对 3 种常用溶液配制 ABO 反定型红细胞悬液进行比较。**方法** 利用生理盐水、低离子溶液、Sysmex 血液分析仪用稀释液 3 种溶液制备 2% 的红细胞悬液, $(4\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存,每天对红细胞的凝集强度、红细胞数量和质量、上清液游离血红蛋白进行观察,每 3 天监测一次细菌生长情况等。观察用 3 种溶液制备的反定型红细胞的有效期限。**结果** 用 Sysmex 血液分析仪专用稀释液配制的反定型红细胞有效期仅 6 d,用生理盐水配制的反定型红细胞有效期不到 24 h,低离子溶液配制的反定型红细胞当天溶血。**结论** 用 Sysmex 血液分析仪专用稀释液可制备简便的 ABO 反定型红细胞,有效期 6 d;低离子溶液不适用于配制的反定型红细胞;生理盐水配备的反定型红细胞应每天配制。

【关键词】 血液分析仪专用稀释液; 低离子溶液; 生理盐水; 红细胞悬液; 反定型; 有效期

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2011.20.020 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2011)20-2472-03

Discussion of the three common solution on preparation of red blood cell suspension for reverse ABO typing WAN Fang, LI Zhuo-hua, CHEN Heng, CUI Min-tao (Department of Clinical Laboratory, Tongjiang Hospital, Foshan, Guangdong 528300, China)

【Abstract】 Objective To compare the three common solution on preparation of red blood cell suspension for reverse ABO typing. **Methods** We used three suspension including physiological saline, low ionic solutions, dilution of Sysmex hematology analyzers to prepare 2% liquid of red blood cell suspension, $(4\pm 2)^{\circ}\text{C}$ refrigerators preserved every day, and observed on the strength of agglutination of red blood cells, red blood cell volume and quality, the supernatant of free hemoglobin, then monitored the growth of bacteria one time every three days. We observed validity period of the three red blood cell suspensions for reverse typing. **Results** The validity periods of red blood cell suspension for reverse typing prepared by the dilution of Sysmex hematology analyzers and physiological saline and were 6 days and less than 24 hours, and the suspension prepared by low ionic solutions could only be used in that day. **Conclusion** The dilution of Sysmex hematology analyzers may prepare simple reverse ABO typing of red blood cells, low ionic solution does not suitable for the preparation, and the suspension prepared by saline should be prepared every day.

【Key words】 dilution of Sysmex hematology analyzers; low ionic solution; physiological saline; red blood cell suspensions; reverse typing; validity

本院日常使用的 ABO 反定型红细胞悬液为商品化试剂,由于运输时间、保存温度、使用期限的原因,偶尔会有溶血、过期、断货的情况,考虑到成本及工作需要,作者尝试自行配制反定型红细胞。查看相关文献,目前常用的配制 ABO 反定型红细胞溶液主要有生理盐水^[1]、低离子溶液^[2]、血细胞分析仪专用稀释液^[3]、CPD 细胞保存液^[4]等,由于 CPD 细胞保存液在一般检验科不常有,所以作者用前 3 种溶液配制 ABO 反定型红细胞悬液,报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 标准抗 A、抗 B 单克隆抗体购自长春博德生物技术有限责任公司(批号:20100507);RhD(IgM)-血型定型试剂(单抗隆抗体)购自上海血液生物医药有限责任公司(批号:20100218);Sysmex 血液分析仪用稀释液(批号:G0470);0.9%氯化钠注射液(四川科伦药业,批号:B100304 K);低聚子溶液(珠海贝索,批号:10072);Sysmex XS-800i 全自动血细胞分析仪;重庆天海 CMIS 型细胞医学图像分析系统;X5 型血库专用离心机;白洋离心机;Kayto RT-6000 酶标分析仪;底物 A、显色剂 B、终止液均为新创公司产品(批号:

2010056608);血培养平板(环凯,批号:10092002Y)。

1.2 观察指标 在反定型红细胞悬液制备的当天(4 h 内)和前 4 天每天取样检查下列 4 个项目:(1)溶血情况和上清液游离血红蛋白(Hb);(2)红细胞(RBC)凝集强度检测;(3)RBC 数量及变异系数检测;(4)RBC 形态显微镜检查。每 3 天做 1 次细菌培养,菌落计数。从第 4 天开始只观察用 Sysmex 血细胞分析仪专用稀释液配制的 RBC 悬液。

1.3 方法

1.3.1 试剂 RBC 制备^[1] (1)取 3 人份同型新鲜 A、B、O 型 RBC 等量混合;(2)用生理盐水洗涤,3 400 r/min 离心 3 min,共 3 次,并尽量去除 RBC 层上的白膜层[白细胞(WBC)和血小板(PLT)]^[5];(3)取压积 RBC,分别以生理盐水、Sysmex 血液分析仪专用稀释液、低离子溶液配成 2% 的 A、B 和 O 型 RBC 悬液;(4)将 3 种血型 RBC 悬液混匀分装注入 0.5 mL 的塑料子弹头中,其中生理盐水法配制溶液分装 5 管,共 15 管,低聚离子分装 5 管,共 15 管,血细胞稀释液分装 25 管,共 75 管,置 $(4\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存,前 4 d 每天取一支样品检测并记录结果,第 5 天开始只取血细胞稀释液配制的 RBC 悬液观察并记录

结果。

1.3.2 溶血情况观察和上清液游离 Hb 测定 采用“A、B 液法”^[6]测定血浆游离 Hb,为了便于统一测试,每天取 3 种溶液配制的 RBC 悬液,于室温平衡,做完细菌培养、细胞计数、凝集强度测定后,离心取上清液置于-20℃冰箱冷冻保存,每一种溶液每天只留取 1 份标本用于测量游离 Hb 浓度,筛选方法为,离心后先肉眼观察并记录颜色,如在某一天肉眼可见明显溶血,留取此上清液冰冻保存后,继续观察 1 d,再留取上清液冰冻保存,随后停止再观察此类溶液。

1.3.3 细菌污染情况观测 在生物安全柜中,将 3 种稀释液配制的 RBC 悬液取出摇匀,用定量加样枪取 10 μL 涂布在血培养基上,置 35℃温箱培养 24 h 后,观察有无细菌生长,计数菌落数量。

1.3.4 RBC 凝集强度及特异性测定 采用试管法^[1],首先取标准抗血清,测试抗体效价^[1],结果为抗 A 1:512、抗 B 1:256,用生理盐水进行倍比稀释,将血清抗体效价稀释为 1:16,用稀释好的抗 A、抗 B 抗体测定反定型 RBC 的抗原,观察凝集强度的变化。D 抗原阳性的 O 型血试剂 RBC 暂用抗 D 抗体检测,从凝集强度的变化反映其抗原的强弱变化。从制备日起,每天做一次抗原凝集强度测定,并记录实验结果。

1.3.5 细胞计数 用 System 800 全自动血细胞分析仪测定不同观察时间 2%浓度 RBC 中的 RBC 数量及变异系数情况。

1.3.6 RBC 形态观察 用天海 CMIS 型细胞医学图像分析系统观察 RBC 形态上的变化。

2 结 果

3 种溶液配制 ABO 反定型 RBC 观测结果比较见表 1。

2.1 溶血情况和上清液游离 Hb 测定结果 用低离子溶液配制的 RBC 悬液,在制备当天及第 2 天均产生肉眼可见轻度溶

血,测定上清液游离 Hb 浓度分别为 141.2 mg/L 和 173.5 mg/L。用生理盐水配制的 RBC 悬液观察当天游离 Hb 为 14.1 mg/L,从第 2 天开始,虽然无肉眼可见溶血,但实际测定游离 Hb 依次为 66.6、180.8、255.2、294.2 mg/L,均大于 40 mg/L;用血细胞稀释液配制的 RBC 比较稳定,配制前 6 d 每天测定游离 RBC 均很低,小于 40 mg/L,到第 7 天溶血明显增加,肉眼可见 RBC 与上清液界面有轻度溶血,混匀后离心,测定游离 Hb 260.9 mg/L,此后游离 Hb 浓度迅速增高。

2.2 细菌污染情况观察结果 以溶血时间为限,只做过两次细菌培养,分装的 RBC 悬液在溶血前后均无细菌生长。

2.3 RBC 抗原凝集强度及特异性测定结果 用低离子溶液配制的 RBC 悬液,因为溶血的缘故,只测定 2 d,用当天稀释的效价为 1:16 抗血清测定,凝集强度为++++,上清液溶血肉眼观察不明显;用生理盐水配制的 RBC 悬液连续测定 5 d,每天凝集强度为++++,上清液肉眼观无溶血。用血细胞稀释液配制的 RBC 悬液前 6 d 凝集强度为++++,上清液肉眼观无溶血,第 6 天在 RBC 层与上清液交界层之间有明显溶血,凝集程度却没有下降。

2.4 配制的试剂 RBC 数量变化 3 种稀释液配制的试剂 RBC 数量变化波动较小,到了第 7 天,仅有稍微的减少,变化不明显,但是变异系数在溶血前后有较大变化。

2.5 RBC 形态学观察结果 保存过程中,用低离子溶液配制的 RBC 形态最为完整,体积较大,无皱缩或变形现象;用 System 血液分析仪用稀释液配制的 RBC 在配制当天,形态完整,第 2 天开始有约 20%皱缩变形,第 4 天有约 50%~60%皱缩,连续观察,皱缩逐渐增多;用生理盐水配制的 RBC 第 1 天有 20%少量皱缩,第 3 天皱缩明显增加。

表 1 3 种溶液配制 ABO 反定型 RBC 观测结果比较

时间	生理盐水						低聚离子溶液						血细胞稀释液					
	RBC 计数(×10 ⁹)	RDW CV	上清液颜色	凝集强度	细菌	游离 Hb	RBC 计数(×10 ⁹)	RDW CV	上清液颜色	凝集强度	细菌	游离 Hb	RBC 计数(×10 ⁹)	RDW CV	上清液颜色	凝集强度	细菌	游离 Hb
当天	0.15	11.4	无色	4+	—	14.1	0.14	20.7	淡红	4+	—	141.2	0.15	11.5	无色	4+	—	15.3
每 1 天	0.15	10.9	无色	4+	—	66.6	1.15	15.3	淡红	4+	—	173.6	0.16	11.3	无色	4+	—	15.3
每 2 天	0.15	12.0	淡黄	4+	—	180.8	—	—	—	—	—	—	0.15	11.6	无色	4+	—	16.8
每 3 天	0.15	11.6	淡黄	4+	无	255.2	—	—	—	—	—	无	0.16	12.2	无色	4+	无	15.6
每 4 天	0.15	12.0	淡黄	4+	—	294.2	—	—	—	—	—	—	0.16	13.0	无色	4+	—	15.6
每 5 天	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.16	14.9	淡黄	4+	—	24.6
每 6 天	0.15	16.1	淡红	4+	—	—	—	—	—	—	—	—	0.14	15.8	淡黄	4+	—	38.6
第 7 天	—	—	—	—	无	—	—	—	—	—	—	—	—	15.8	淡红	4+	无	260.9

注:RDW CV 表示红细胞分布宽度变异系数。—表示无数据。

3 讨 论

ABO 反定型 RBC 研制的重点有三个方面^[7]:一是维持 RBC 活性,尽量减慢细胞新陈代谢;二是保护好 RBC 膜上抗原物质;三是建立有效期观察指标,监测试剂 RBC 有效期。

商品化的 ABO 反定型 RBC 有效期为 3 个月,与自制反定型 RBC 试剂相比具有使用方便、有效期长、质量稳定的优点,所以在医院、血站等广泛使用。但是,商品化的 ABO 反定型

RBC 通过厂家转试剂商再送至检验科时,实际使用有效期多为一个多月左右,并且由于运输保存等原因,到达时 RBC 悬液会有轻微溶血现象,所以每次购买数量少,如果某一段时间标本量过多或过少,可能出现断货或过期浪费现象。

生理盐水是医院最常用的溶剂,用生理盐水配制反定型 RBC,经济好用,缺点是保存有效期短,最好能每天配制。本试验中也发现,配制的 RBC 第 2 天,肉眼观察不溶血,凝集强度

合格,但游离 Hb 已超过 40 mg/L;低离子溶液是聚凝胺试剂成分的一种,有降低介质的离子强度,减少 RBC 周围的阳离子云,促进 RBC 和血清(血浆)中的抗体结合的作用,在婴儿 ABO 血型鉴定^[8]、新生儿溶血病^[9]、ABO 反定型检测^[2]等方面应用效果较好。但作者在配制当天,马上离心,观察到肉眼可见溶血,怀疑配制方法有误,重复操作后依旧有溶血现象。低离子溶液主要成分为 5%葡萄糖、0.2%乙二胺四乙酸等,从理论上无法解释溶血原因,在用凝聚胺法做交叉配血时很少出现溶血现象,推测原因可能为,交叉配血时,用 2 滴血清加 1 滴 3%~5%RBC 悬液,混匀后加 0.65~0.80 mL 低离子溶液,再加其他试剂,如果有轻度溶血,也会被稀释,肉眼很难观察到。作者在配制 2%反定型 RBC 悬液时加入的 RBC 数量较交叉配血时多,肉眼容易观察,所以使用低离子溶液配制反定型 RBC 悬液并不合适。本人对低离子溶液在交叉配血中的应用也有些疑问和不懂,还有待进一步学习,同时查《全国临床检验操作规程》第 3 版有低离子强度盐溶液配制 RBC 悬液检测不规则抗体的方法,所以可能是理解错误,同时规程也提出最好当天配用,所以没有继续试验。用血细胞分析仪稀释液配制反定型 RBC 已有报道,周华友等^[3]分别用 Coulter STKS 稀释液、Bayer2120 稀释液和雅培 CD1700 稀释液配制反定型 RBC 试剂,从保存期、溶血性、抗原性、细菌等几个方面探讨,得出了用血细胞分析仪稀释液配制试剂 RBC 简单且经济,有效期可达 2 周,适于基层医院血库使用,值得推广的结论。因为本科室在用的血细胞分析仪 XS-800i 和 XE-2100 全部是希森美康公司的产品,配套试剂均为希森美康原装试剂,稀释液的成分与其他厂家血细胞分析仪稀释液不同,所以不能简单套用,在实际检测过程中发现作者的推测是正确的,Sysmex 血细胞分析仪稀释液用于反定型 RBC 只能保存 6 d,保存期内 RBC 有轻中度皱缩,但不影响抗原性。为了正确反映 RBC 的检测灵敏度,作者在试验中采用 1:16 效价的 A、B 抗体,理由是邓永福等^[10]的研究表明,90%人群血清/血浆抗体效价均分布于 1:16 以上,购买的抗 A、抗 B 抗体效价高达 1:512 与 1:256,不足以反映出 RBC 检测灵敏度,所以在试验中采用预稀释 1:16 抗血清,试验中还发现使用溶血后的 RBC 悬液,凝集强度仍然有+++以上。

在实验设计方面如果是无菌操作且用子弹头分装每天用量的情况下,可以取消细菌培养这一项,为了减少用血细胞分析仪稀释液中添加成分对 RBC 形态的影响,曾尝试加入少量经过抗体筛选后再经 56℃灭活处理的 AB 型血清,比例 1:1,效果较好,尤其在前 2 d,RBC 形态完整性是远远优于生理盐水配制的悬液,与相应抗血清结合,凝集强度不受影响,但由于人的血型系统复杂,也考虑到血型测定重要性,所以取消这种做法,同时也提示出,选用牛血清或许其他不干扰测定的蛋白质可以有利于改善 RBC 的保存期。游离 Hb 的检测方法,根据不同的色原,主要有邻-甲联苯胺法^[1]、氰化高铁 Hb 法^[1]、A、B 液法^[6]、过氧化氢醋酸重铬酸钾法^[11]、氯丙嗪两点

法^[12]等,由于联苯胺致癌、氰化钾有剧毒,过氧化氢醋酸重铬酸钾法与氯丙嗪两点法需要配制试剂、手工操作、步骤较繁琐,而“A、B 液法”操作简单,仪器与试剂来源方便,但要求做标准曲线,所以每天离心后将上清液冷冻保存,统一时间测定,有利于保证测定结果的一致性。

当前,所有自配反定型 RBC 悬液的难题都集中在如何保存 RBC 形态完整性,延长细胞保存期,因为血细胞稀释液中加入有少量防腐剂,在保存期限方面优于生理盐水,所以在商品化反定型 RBC 试剂不足、标本量少或其他影响因素时可考虑用血细胞稀释液配制的反定型 RBC 悬液,但每个实验室应根据实际情况做相关的对比试验,而不能简单套用。本试验得出结论,用 Sysmex 血液分析仪专用稀释液可制备简便的 ABO 反定型 RBC,有效期 6 d;凝聚胺试剂中的低离子溶液不适用于配制反定型 RBC;用生理盐水制备反定型红细胞应每天配制。

参考文献

- [1] 叶应妩,王毓三,申子瑜.全国临床检验操作规程[M].3版.南京:东南大学出版社,2006.
- [2] 王振财,王照.低离子溶液在 ABO 反定型检测中的应用[J].吉林医学,2009,30(7):652-653.
- [3] 周华友,陈少彬,于艳涛,等.用血细胞分析仪稀释液配制 ABO 反定型试剂红细胞[J].检验医学,2009,24(3):113-115.
- [4] 余晋林,伍伟健.ABO 反定型试剂红细胞配制方法的探讨[J].中国输血杂志,2006,19(4):293-295.
- [5] 中华人民共和国卫生部.中国输血技术操作规范[M].天津:天津科学技术出版社,1997:15-17.
- [6] 魏寿忠,肖小慧,许冰峰.“A、B 液法”测定血浆游离血红蛋白的探讨[J].中国输血杂志,2005,18(6):491-492.
- [7] 罗广平,汪传喜,肖露露.GZB 试剂红细胞 4℃保存液的研究及其临床应用[J].实用医学杂志,1995,11(3):154-155.
- [8] 李宏科,袁凤梅.低离子溶液法在婴儿 ABO 血型鉴定中的应用[J].中国输血杂志,2008,21(6):449-450.
- [9] 苏丽霞,耿伏生.低离子溶液配制疏基试剂在新生儿溶血病检查中的应用[J].中国现代医生,2009,46(4):128.
- [10] 邓永福,祝晓琴,张晓露,等.献血者抗-A、抗-B 抗体效价调查[J].临床输血与检验,2009,11(2):140-141.
- [11] 相开幕,陶相光,刘茂忠.过氧化氢醋酸重铬酸钾测定血浆游离血红蛋白[J].上海医学检验杂志,1996,11(2):101.
- [12] 赵元明,刘晓钟.氯丙嗪两点法测定血浆游离血红蛋白[J].陕西医学检验,1997,12(3):27.

(收稿日期:2011-05-22)