

• 论 著 •

不同抗凝剂和温度对红细胞渗透脆性试验结果的影响^{*}

潘干华¹, 李哲刚¹, 申芑子¹, 黄 勇¹, 刘国先¹, 郑立新²

(1. 广东省佛山市南海区计划生育服务站 528200; 2. 广东省计划生育科研所, 广州 510600)

摘要:目的 探讨不同抗凝剂和温度对红细胞渗透脆性试验结果的影响。方法 40 例肝素锂抗凝血分别在 16 ℃、23 ℃ 和 37 ℃ 下进行红细胞渗透脆性试验; 另取 40 例新鲜血液分别用 EDTA-K₂、枸橼酸钠(ACD)、肝素锂在 37 ℃ 下进行测定, 比较不同试验条件下溶血率的差异。各组以肝素锂抗凝血在 37 ℃ 测定结果为对照, 分为低脆性组和正常脆性组加以比较。结果 16 ℃、23 ℃ 和 37 ℃ 组脆性结果比较, 正常脆性组在 23 ℃ 的溶血率结果差异无统计学意义($P>0.05$), 其他各样本组的溶血率差异均有统计学意义($P<0.01$), 其中低脆性组差异最为显著, 23 ℃ 和 16 ℃ 的结果分别平均偏高 28.7% 和 59.7%; ACD、EDTA-K₂ 与肝素锂抗凝血红细胞脆性结果比较, 各样本组差异均有统计学意义($P<0.01$), 其中低脆性组差异最为显著, 分别平均偏高 16.7% 和 37.7%。结论 不同抗凝剂和温度对红细胞渗透脆性影响较大, 应使用试剂盒所规定使用的肝素类抗凝剂而不宜使用 EDTA-K₂ 和 ACD 抗凝, 并应严格控制在 37 ℃ 恒温水浴条件下测定。

关键词: 抗凝药; 温度; 红细胞; 渗透脆性; 临床试验

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.04.001

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)04-0433-02

Influences on erythrocyte osmotic fragility tests result with different anticoagulants and temperatures

Pan Ganhua¹, Li Zhegang¹, Shen Yuanzi¹, Huang Yong¹, Liu Guoxian¹, Zheng Lixin²

(1. Nanhai Family Planning Service Station, Foshan Guangdong 528200, China;

2. Guangdong Family Planning Institute, Guangzhou 510600, China)

Abstract: **Objective** To discuss influences on erythrocyte osmotic fragility (one-tube test) result with different anticoagulants and temperatures. **Methods** In order to evaluate the differences of the hemolysis rate under different conditions, 40 anticoagulative blood samples with lithium-heparin were tested for red cell osmotic fragility test at 16 ℃, 23 ℃, 37 ℃, at the same time, and 40 EDTA-K₂, sodium citrate and lithium-heparin treated fresh blood samples for controlled were tested at 37 ℃. Each group was divided into low brittle group and normal brittle group, with anticoagulative blood samples with lithium-heparin served as control. **Results** Compared with 16 ℃ and 37 ℃ group, the hemolysis rate of normal brittle group at 23 ℃ has no significant difference ($P>0.05$), but other groups all have significant difference ($P<0.01$), especially the low brittle group. The average of 23 ℃ and 16 ℃ group were higher 28.7% and 59.7% respectively. Each group has significant difference ($P<0.01$) compared with sodium citrate, EDTA-K₂ and lithium-heparin treating blood groups, especially the low brittle group. The average of the low brittle group was higher 16.7% and 37.7% respectively. **Conclusion** Different anticoagulants and temperatures have great influence on erythrocyte osmotic fragility tests. Neither EDTA-K₂ nor sodium citrate should be used, but anticoagulant such as lithium-heparin provided from the kit. And the tests should be carried out at 37 ℃ in constant water bath strictly.

Key words: anticoagulants; temperature; erythrocytes; osmotic fragility; clinical trial

红细胞渗透脆性试验(以下简称一管法)是临床常用的地中海贫血(以下简称地贫)筛查项目^[1]。一管法具有操作简便、快速、易用仪器量化结果等优点而被广泛采用。文献报道中笔者发现, 在使用该方法进行地贫筛查时, 所使用的抗凝剂和反应温度不一^[2~4], 这可能是导致各文献报道的关于一管法筛查地贫效果的评价差别较大的原因。本文通过比较使用不同抗凝剂和不同温度条件下的测定结果, 探讨影响该方法准确性的关键因素。

1 材料与方法

1.1 标本来源与分组 80 例样本来自广东省佛山市南海区计划生育服务站优生门诊, 其中 40 例用肝素锂真空采血管抽取血样, 为温度对比组样本。另外 40 例分别采用肝素锂、枸橼酸钠(ACD)、EDTA-K₂ 真空采血管抽取血样, 为抗凝剂对比

组样本。各组以肝素锂抗凝血在 37 ℃ 测定结果为对照, 分为低脆性组(溶血率小于 65%)和正常脆性组(溶血率大于或等于 65%)加以比较。

1.2 耗材与试剂 肝素锂和 EDTA-K₂ 真空采血管由美国 BD 公司生产; ACD 由成都瑞琦科技实业有限责任公司生产; 红细胞渗透脆性试验试剂由广州市米基医疗器械有限公司提供。

1.3 方法 温度对比组的 40 例肝素锂抗凝血样, 按照试剂说明书操作, 分别在 37 ℃ 水浴、23 ℃ 室温和 16 ℃ 水浴中进行测定(预温、加样、加 B 液操作均在同一温度条件下进行)。3 种抗凝剂的各 40 例血样, 按照试剂说明书操作, 均在 37 ℃ 水浴条件下进行测定。

* 基金项目: 广东省计生委科研项目基金(编号 2008018)。

1.4 统计学处理 检测数据用 SPSS10.0 统计软件处理,组间差异用配对 *t* 检验进行分析。

2 结 果

2.1 不同温度条件下红细胞渗透脆性试验结果比较 23 ℃ 室温和 16 ℃ 水浴的结果与 37 ℃ 水浴的结果比较,正常脆性组 23 ℃ 室温下脆性结果差异无统计学意义外(*P*>0.05),其他各样本组差异均有统计学意义(*P*<0.01),且温度越低,溶血率值越高。其中低脆性组的差异最大,23 ℃ 室温和 16 ℃ 水浴的结果分别平均偏高 28.7%和 59.7%,见表 1。

表 1 温度对比组红细胞渗透脆性试验结果 ($\bar{x}\pm s$,溶血率%)				
组别	<i>n</i>	肝素锂抗凝血 (37 ℃水浴)	肝素锂抗凝血 (23 ℃室温)	肝素锂抗凝血 (16℃水浴)
全部血样	40	67.7±24.4	72.3±21.2(6.7)★	78.5±17.0(15.9)★
低脆性组	13	37.5±19.7	48.3±22.0(28.7)★	59.9±19.4(59.7)★
正常脆性组	27	82.3±6.5	83.9±4.7(1.9)△	87.5±2.2(6.3)★

():内数值是与对照组(肝素锂抗凝血在 37 ℃ 的结果)比较的平均偏高百分率;与对照组比较,★*P*<0.01,△*P*>0.05。

2.2 抗凝剂对比组红细胞渗透脆性试验结果比较 在 37 ℃ 水浴条件下,ACD、EDTA-K₂ 与肝素锂结果比较,各样本组差异均有统计学意义(*P*<0.01),其中低脆性组差异最为显著,分别平均偏高 16.7%和 37.7%,正常脆性组影响较小,分别平均偏高 6.8%和 9.9%,见表 2。

表 2 抗凝剂对比组红细胞渗透脆性试验结果 ($\bar{x}\pm s$,溶血率%)				
组别	<i>n</i>	肝素锂抗凝血 (37 ℃水浴)	枸橼酸钠抗凝血 (37 ℃水浴)	EDTA-K ₂ 抗凝血 (37℃水浴)
全部血样	40	72.6±20.7	78.2±20.5(7.7)★	81.7±18.6(12.5)★
低脆性组	8	34.4±13.3	40.2±13.9(16.7)★	47.4±14.8(37.7)★
正常脆性组	32	82.2±5.5	87.7±4.1(6.8)★	90.3±2.9(9.9)★

():内数字是与对照组(肝素锂抗凝血在 37 ℃ 的结果)比较的平均偏高百分率;与对照组比较,★*P*<0.01。

3 讨 论

据文献报道,肝素为红细胞渗透脆性试验的理想抗凝剂^[5],37 ℃ 水浴为试剂操作规范设定的反应温度,因此本文以肝素锂抗凝血样在 37 ℃ 水浴条件下测定的结果为对照。本研究结果显示,温度对红细胞渗透脆性影响较大,温度越低红细胞脆性越高,溶血率越高,而且对红细胞脆性低样本的影响尤为明显,平均高达 37.7%。红细胞的渗透脆性与红细胞膜的上 Na⁺-K⁺-ATP 酶的活性有关^[6],温度的降低可能降低了该酶的活性,使红细胞在低渗溶液中维持细胞内外 Na⁺、K⁺ 离子的平衡能力降低而容易发生溶血。据文献报道,反应时间对试验结果的影响较小,在同一温度条件下,反应 60 min 的结果与 5 min 结果只有轻微增加^[7]。笔者认为,在特定低渗溶液中,一定时间内血样的溶血率与反应液的温度可能存在一定的

平衡状态关系。为了增加本试验方法的准确性和可比性,将反应设定在 37 ℃ 水浴中进行。而且为避免温度降低对结果造成的不可逆影响,要求 A 液预温、加样、混匀、加 B 液等操作步骤应在 37 ℃ 水浴中进行。

ACD 和 EDTA-K₂ 均可使红细胞渗透脆性升高,EDTA-K₂ 对低脆性样本组的影响较为严重,与肝素锂比较平均偏高 37.7%。EDTA-K₂ 抗凝血的 EDTA-K₂ 最终浓度为 1.8 mg/mL,渗透压明显高于血浆渗透压。采血后,由于红细胞停留在一个高渗环境中,红细胞内的渗透压随之升高。在进行红细胞渗透脆性测定时,红细胞进入低渗环境中,细胞内的渗透压越高,水分进入细胞内越快,细胞破裂速度加快,这可能是 EDTA-K₂ 抗凝血红细胞渗透脆性增加的原因。ACD 作为抗凝剂应用时,其浓度为 109 mmol/L,渗透压比血浆渗透压低,采血后,红细胞处于一个稍低于血浆渗透压的环境中,在进行红细胞渗透脆性试验之前,少部分水分已经进入细胞内,导致红细胞渗透脆性增加^[8]。

值得重视的是不同温度和抗凝剂对低脆性组样本的影响比正常脆性组尤为严重,使部分红细胞脆性低的样本溶血率超过了 65%,导致该项目作为地贫筛查时出现假阴性结果。这可能是该方法作为地贫筛查试验时影响灵敏度的重要因素之一。

红细胞渗透脆性试验操作简便实用,仪器设备简单,且有报道可检出部分红细胞平均体积大于 80 fL 的地贫基因携带者^[9],因此是目前筛查地贫的有效方法之一。但它只是一项测定红细胞理化性质的试验,反映红细胞渗透脆性高低的溶血率值受温度、电解质、样本保存条件和时间、pH 值、离心力等多种因素影响。因此,笔者认为应对影响结果准确性的关键因素严格控制,建议使用肝素类抗凝剂而不宜使用 EDTA-K₂ 和 ACD,并在 37 ℃ 恒温水浴条件下进行测定。

参考文献

[1] 杜传书.地中海贫血研究的现状与未来[J].中华医学遗传杂志,1996,13(3):257-258.

[2] 吴学礼,周玉球,肖鸽飞,等.三种红细胞渗透脆性试验用于地中海贫血筛查的临床评价[J].海南医学,2004,15(4):15-17.

[3] 杨小华,马福广,何雅军.两种方法检测 α 和 β-地中海贫血基因携带者的结果比较[J].临床输血与检验志,2003,11(5):260-262.

[4] 周艳洁,阮丽明,何桂琼,等.探讨地中海贫血筛查方案及南宁农村育龄人群基因型分析[J].实用预防医学,2008,15(4):984-987.

[5] 熊立凡.临床检验基础[M].3 版.北京:人民卫生出版社,2003:8.

[6] 王也飞,胡翊群.红细胞膜蛋白异常与膜骨架相关溶血性贫血的发生[J].诊断学理论与实践,2009,8(1):104-107.

[7] 钟亚玲,腾飞鹏,陈梅,等.两管法测定红细胞溶血率[J].上海医学检验杂志,1996,11(4):217-219.

[8] 肖小慧,魏寿忠,黄素丹,等.不同抗凝剂对红细胞渗透脆性试验结果的影响[J].检验医学与临床,2009,6(12):966-968.

[9] 陆国辉.产前遗传病诊断[M].广州:广东科技出版社,2002:169.

(收稿日期:2010-05-10)