

• 检验仪器与试剂评价 •

低离子强度溶液在输血相关检验中的应用研究

周守容, 邓安彦[△], 吴春磊, 穆万洋, 刘 敏, 邓小倩

(四川省南充市中心医院/川北医学院第二临床医学院, 四川南充 637000)

摘要:目的 探索低离子强度溶液(LISS)在输血相关检验中的最佳应用方式。方法 选择人源的抗 D 血清进行标化,与 D 抗原阳性的筛选细胞分别进行聚凝胺试验、间接抗人球蛋白试验和微柱凝胶试验,根据最佳实验结果来确定 LISS 液在不同的实验环境下的最佳使用方式。结果 该人源抗 D 血清用 AB 型血浆进行 1:16 稀释后对后续的实验研究最佳;LISS 液在聚凝胺实验中的加入量至少应为 5 滴,才能取得最佳效果;在间接抗人球蛋白试验中加入 2 滴 LISS 后反应速度明显加快,加入 2 滴 LISS 液后温浴 10 min 的致敏效果和未加 LISS 液温浴 60 min 的致敏效果相当;在微柱凝胶试验中,与用生理盐水配制的红细胞悬液相比,用 LISS 配制的红细胞悬液的实验结果稍强,但二者均弱于用生理盐水配制的红细胞悬液与抗 D 反应的基础上再追加 1 滴 LISS 的反应模式。结论 LISS 液可以加快红细胞抗原与抗体结合的速度,缩短了实验时间,提高输血相关实验的检测效率。

关键词:低离子强度溶液; 聚凝胺试验; 抗人球蛋白试验; 微柱凝胶试验

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.22.058

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)22-3063-02

低离子强度溶液(LISS)于 1976 年首次被应用于红细胞抗体筛查中^[1],由于 LISS 可以加速抗原抗体结合速率,具有重要的临床应用推广价值,但国内有关 LISS 液在临床输血相关实验中的具体应用实践性报道并不多见,为了让 LISS 在临床输血相关实验使用中取得最佳效果,本文对其技术细节做相应探索性研究,现报道如下。

1 材料与与方法

1.1 材料与仪器 上海血液中心国家参比实验室的人源抗 D 抗体(IgG 型批号 20120823),上海血液生物医药有限公司生产的多特异抗人球蛋白试剂(批号 20120228)、D 抗原阳性的筛选谱细胞(批号 20130315)、聚凝胺试剂(批号 20120524),微柱凝胶卡购自瑞士达亚美公司(批号 50531.74.11),凝胶卡温浴和专用离心机为瑞士达亚美公司产品,离心机为日本久保田公司产品。

1.2 方法

1.2.1 人源抗 D 血清的标准化 取试管 8 支,分别标注 2、4、8、16、32、64、128 和 256,首先在每支试管中加入新鲜的 AB 血清 100 μ L,再取 100 μ L 人源抗 D 血清加入到第 1 个玻璃试管中,充分混匀后吸取 100 μ L 至下一试管中,至 32 倍稀释管后更换枪头以避免样本的携带污染,如此依次进行倍比稀释至最后 1 管后吸取 100 μ L 弃去。然后在上述每个试管中加入 D 抗原阳性的 II 号筛选细胞 50 μ L,混匀后加入 2 滴 LISS 液放置 37 $^{\circ}$ C 水浴箱温浴 10 min 取出后 3 次洗涤扣干,加入 1 滴多特异抗人球蛋白试剂摇匀后 3 400 r/min 离心 15 s 观察并记录凝集结果,选择最先出现“2+”凝集强度的稀释比例作为后续试验的工作液。

1.2.2 聚凝胺试验中 LISS 液加入量的研究 取试管 10 支,分别标注编号 1~10,在每支试管中分别加入 100 μ L 标化的经献血员 AB 血清和 II 号筛选 D 抗原阳性的谱细胞 50 μ L,1~10 号试管中分别加入 LISS 液量为 0、1、2、3、5、8、10、12、15、20 滴(每滴约 50 μ L),室温放置 1 min 后加入 2 滴聚凝胺轻轻摇匀后 3 400 r/min 离心 60 s,然后倒掉上清但不扣干轻摇试管确保每个试管中的细胞聚集成细胞扣且摇动不能完全散开后再在每个试管中加入重悬液 1 滴,轻摇 1 min 观察并记录凝集结果。

1.2.3 LISS 液在间接抗人球蛋白试验(IAT)中的应用 取试管 12 支分成 2 排分别标注 120、60、30、10、5、0 min,最先在 120 min 管中加入 100 μ L 上述标化抗 D 血清和 50 μ L II 号筛选 D 抗原阳性的谱细胞,其中一管加入 2 滴 LISS 液另一管不加 LISS 摇匀后分别放入 37 $^{\circ}$ C 水浴箱温浴 120、60、30、10、5、0 min,使 6 组试管的在同一时刻到达各自的温浴时间,一同用生理盐水进行 3 次洗涤扣干后加入多特异抗人球蛋白试剂 1 滴,离心摇匀后观察并记录各个温浴时间点加 LISS 液和不加 LISS 液所对应的凝集强度。可以得出不同温浴时间对抗体致敏细胞的影响,同时也可以比较相同的温浴时间 LISS 加入后对抗体致敏细胞效率的影响。

1.2.4 LISS 液在微柱凝胶卡检测中的应用 将人源 IgG 抗 D 血清从稀释度 128 稀释到稀释度 4 096,共 6 个稀释度备用,再取一新鲜 O 型 D 抗原阳性的红细胞献血员标本 3 次洗涤后取压积红细胞分别用生理盐水和 LISS 液配制成 3% 的红悬液备用。取 3 张凝胶卡每孔下面分别标注“128~4096”再编号 1、2、3。在 1 号凝胶卡的每孔加入 20 μ L 3% 盐水稀释的红细胞悬液,再分别加入 40 μ L 相应稀释度的抗 D 血清;在 2 号凝胶卡的每孔分别加入 20 μ L 3% LISS 液稀释的红细胞悬液,再分别加入 40 μ L 相应稀释度的抗 D 血清;3 号凝胶卡同 1 号卡,但在每孔中在追加 1 滴 50 μ L 的 LISS 液。将 3 张凝胶卡一同孵育 15 min 后离心观察结果。

2 结 果

2.1 筛选细胞分别与 2、4、8、16、32、64 倍稀释的抗 D 血清反应的凝集强度依次为:4+、4+、4+、2+、1+、1+“(w 表示弱,强度介于该强度等级和下一级凝集强度之间)。可见 1:16 的抗体稀释度反应强度为“2+”,在进行下一步的试验时可以获得更大的凝集强度改变范围。因此 IgG 类人源抗 D 抗体的浓度选择 1:16 作为最佳的稀释比例来进行后续的相关试验。

2.2 选择标化的抗 D 血清与抗原进行聚凝胺介质中抗原抗体反应,通过向反应体系中加入不同量的 LISS 液观察试验的凝集强度,本研究中聚凝胺试验中 LISS 液的加入量至少应为 5 滴,才能取得最佳的试验效果。

2.3 将 2 份 6 管 100 μ L 标化血清加入 50 μ L 的标准红细胞悬液分别进行加入 2 滴 LISS 和不加 LISS 的抗人球蛋白试验,

[△] 通讯作者, E-mail: feibenzhishua@sina.com。

然后分别在 37 ℃ 水浴箱中孵育 120、60、30、10、5、0 min,使其终点时间一致,一同取出后经 3 次洗涤,加入多特异抗人球蛋白试剂,离心后观察结果,结果见表 1。实验结果显示 LISS 可以明显加快抗体致敏到细胞表面的速度,加入 LISS 10 min 的致敏效果和不加 LISS 状态下的 60 min 的致敏效果相当;在 60 min 内抗体的致敏量随时间的推移而增加,但超过 60 min 后抗体的致敏量并不随时间的增加而增加,反而有减少的趋势。

表 1 IAT 在 LISS 介质和盐水介质中不同孵育时间点的凝集强度*

编号	温浴时间(min)	LISS 介质凝集强度	盐水介质凝集强度
1	120	2+ ^s	2+
2	60	4+	2+ ^s
3	30	3+	2+
4	10	2+ ^s	1+ ^s
5	5	2+	1+
6	0	1+	+

*:s 表示强,强度介于该强度等级和上一级凝集强度之间。

2.4 将上述工作液再进一步稀释至 128~4 096 比例,分别各取 40 μL 与 20 μL 盐水配制的 3%红细胞悬液(1 号卡)、LISS 配制的 3%红细胞悬液(2 号卡)以及同 1 号卡操作相同再追加 1 滴 LISS(3 号卡)在微柱凝胶介质反应,经孵育、离心后观察结果,各个卡每孔的凝集强度结果见表 2。用生理盐水配制的红细胞悬液和用 LISS 配制的红细胞悬液在与各个稀释度的抗 D 血清反应强度相比敏感度略低,但两者均低于用生理盐水配制的红细胞悬液与抗 D 反应的基础上再追加 1 滴 LISS 的反应模式,提示该模式可以有效提高抗 D 抗体的检测敏感性。

表 2 在盐水稀释红细胞、LISS 稀释红细胞、盐水稀释红细胞再追加 LISS 模式下的微柱凝胶试验结果比较*

稀释度	1 号卡凝集强度	2 号凝胶卡凝集强度	3 号凝胶卡凝集强度
128	3+	3+	4+
256	2+ ^s	2+ ^s	4+
512	2+	2+ ^s	3+
1 024	1+ ^s	2+	2+ ^s
2 048	1+	1+ ^s	2+
4 096	—	±	1+

*:s 表示强,强度介于该强度等级和上一级凝集强度之间。

3 讨 论

目前认为当抗原抗体的凝集反应发生在等渗生理盐水介质中时,红细胞混悬于等渗盐水中,由于细胞膜上有唾液酸中的羧基离子而带负电,此负电荷形成的排斥力(Zeta 电位)使单个红细胞之间保持一定距离,LISS 可以降低介质的离子强度,从而可降低 Zeta 电位,使抗原抗体的结合速度加快^[2]。不同的实验室所选用的试验方法有所不同,但主要的试验方法有聚凝胺法、抗人球蛋白方法以及微柱凝胶法等。本次试验证实 在上述的 3 种试验方法中 LISS 的引入都改变了原方法学在红细胞抗体检测和交叉配血的效率。

聚凝胺法可检测 IgG 和 IgM 抗体,不需要特殊设备,操作简便、快捷,成本低廉,在各级医院都有广泛应用^[3]。在聚凝胺试验中,通过加入不同量的 LISS 可以引起不同的抗原抗体结

合速率,但加入量至少为 5 滴,LISS 的量过少可能会造成某些低效价抗体的漏检,LISS 量过多则会造成浪费,本次试验结果提示当血清抗体的效价较低时适当提高 LISS 的加入量可以提高低效价抗体的检出率,在常规进行聚凝胺试验中选择 5~10 滴的 LISS 加入量基本可以取得较为满意的结果。在抗人球试验中,每个试管加入 2 滴 LISS 可以大大提高红细胞抗体的检测效率,可以大大缩短红细胞抗体的检测时间,但是通过孵育时间梯度试验证实,在进行抗人球蛋白试验时无论是传统的 IAT 还是加入 2 滴 LISS 试剂的改良 IAT 孵育时间都不要超过 60 min,否则孵育时间过长反而会干扰抗体致敏到红细胞上,导致已经结合到红细胞上的抗体又重新游离到反应溶液中。由于微柱凝胶方法的敏感性较高,易于结果判断,越来越多的临床输血实验室选择该方法进行临床输血相关检测^[4-5]。在微柱凝胶试验中,在 2~3+ 的凝集强度下基本一致,弱凝集如 ± 和 1+w,用盐水稀释的红悬液和 LISS 液稀释的红悬液要相差一个凝集强度,另外改变 LISS 的加入方式即加入用盐水稀释红细胞后再追加 1 滴 LISS 液,最终凝集强度均强于用 LISS 液稀释红细胞的凝集强度,这样不仅可以节约 LISS 液的用量,同时还有利于检测出低效价的抗体。不仅如此,国内学者还把 LISS 液应用到 ABO 血型反应型实验中均取得理想的实验结果^[6-8],目前国内外市场上 LISS 液的生产厂家很多,国外对比研究结果表明不同 LISS 产品性能各异,其中电导率是其重要的技术参数^[9],英国输血服务指南中规定低离子介质的电导率可接受范围是(3.7±0.3)mScm。

从上述实验结果可以看出 LISS 液在临床输血实验的各个方法学中都可以提升检测效率,不同的方法学 LISS 的使用方法又有不同,因此实验室在使用 LISS 液时应根据不同方法学选择最佳的 LISS 的使用方式。

参考文献

[1] Moore HC, Mollison PL. Use of a low-ionic-strength medium in manual tests for antibody detection[J]. Transfusion, 1976, 16(4): 291-296.

[2] American Association of Blood Banks. The technical manual of the American Association of Blood Banks[M]. USA: American Association of Blood Banks, 1977.

[3] 陈学军, 徐兴强, 金小波. 凝聚胺试验在抗体检测和交叉配血中的应用概况[J]. 中国输血杂志, 2002, 15(6): 432-433.

[4] 彭道波, 兰炯采, 王梁平, 等. 用微柱凝胶试验进行交叉配血[J]. 中国输血杂志, 2001, 14(4): 232-232.

[5] 舒象武. 应用微柱凝胶抗球蛋白技术进行交叉配血[J]. 中国现代医学杂志, 2003, 13(13): 116-118.

[6] 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.

[7] 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.

[8] 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, 4(19): 203-204.

[9] Grey D, Connolly M, Erber WN. Comparison of low ionic diluents for use with the Diamed antiglobulin gel test[J]. Transfus Med, 2002, 12(1): 63-69.

(收稿日期:2013-07-01)