

• 检验技术与方法 •

VitC、KCl 及止血敏对 3 种交叉配血方法的影响探讨

万芳,杨 镍,陈 恒,杜金兰,吴学诗
(广东同江医院检验科,广东佛山 528300)

摘要:目的 了解药物维生素 C(VitC)、氯化钾(KCl)及止血敏对盐水介质、微柱凝胶配血法的影响,并与凝聚胺配血法对比。方法 分别在含与不含有特异性抗体两种条件下,加入 KCl 注射液、酚磺乙胺(止血敏)注射液、VitC 注射液、生理盐水,与相应红细胞进行免疫学反应。观察 3 种药物对不同介质配血方法的影响。结果 低浓度的 VitC、KCl 不影响凝聚胺介质配血,止血敏令试验产生假凝集;高浓度的 3 种药物可导致试验失败。盐水介质法检测敏感性略低, VitC、KCl 对试验的影响不明显,而 KCl 组随着抗体被稀释,凝集强度减弱甚至于消失。结论 3 种药物对微柱凝胶配血法均有影响,尤其受 KCl 影响较大。

关键词:维生素 C; 氯化钾; 血型鉴定和交叉配血
DOI:10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2014. 05. 037 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2014)05-0594-03

Investigation on influences of vitamin C, KCL and dicynone on 3 kinds of blood cross matching method

Wan Fang Yang Nie, Chen Heng, Du Jinlan, Wu Xueshi

(Department of Clinical Laboratory, Guangdong Tongjiang Hospital, Foshan, Guangdong 528300, China)

Abstract: **Objective** To comprehend the influences of vitamin C, KCL and dicynone on blood cross matching of saline and microcolumn gel and to compare them with polybrene crossing matching. **Methods** Under the conditions with and without the specific antibody, KCl injection, dicynone injection, vitamin C injection and normal saline were added for conducting the immunological reaction with corresponding RBC. The influences of 3 kinds of drug on different medium cross matching methods of different mediums. **Results** The low concentration of vitamin C and KCL does not affect polybrene cross matching, dicynone makes the experiment to generate pseudoagglutination; the high concentration of these 3 kinds of drug can cause the test to fail. The sensitivity of the saline medium method is slightly lower, the influence of vitamin C and KCL on the test is inapparent, while in the KCL method, with the dilution of antibody, the agglutination intensity is weakened and even disappeared. **Conclusion** 3 kinds of drug all have influences on the microcolumn gel cross matching method, especially KCL.

Key words: vitamin C; potassium chloride; blood grouping and crossmatching

交叉配血试验(CMT)是临床安全输血的重要保证,盐水介质法、凝聚胺介质法及微柱凝胶法是当前常用的 3 种配血方法。有文献[1]报道药物维生素 C(VitC)、氯化钾(KCl)及止血敏可干扰凝聚胺交叉配血试验,这些药物对盐水法及微柱凝胶配血法的影响尚未见报导,为了解这 3 种临床常见药物对盐水介质、微柱凝胶配血法的影响,并与凝聚胺配血法对比,本文在此进行探讨。

1 材料与方法

1.1 材料 VitC 注射液 0.5 g/2 mL; KCl 注射液 1 g/10 mL; 酚磺乙胺(止血敏)注射液 0.5 g/2 mL; 新鲜受血者及供血者血标本; 生理盐水、珠海贝索凝聚胺试剂盒、长春博迅微柱凝胶卡、微柱凝胶专用离心机、X5 血库离心机。

1.2 方法

1.2.1 不含特异性抗体 以 KCl 注射液、酚磺乙胺(止血敏)注射液、VitC 注射液、生理盐水(以下简称 4 种溶液)分别代替血清,与红细胞进行免疫学反应。一共 4 组,每组试管 5 支,每支试管内先加入 100 μL A(+)或 B(+)1%红细胞,再分别加入 100、200、300、400、500 μL 相应的溶液,1、2、3、4 组依次为 KCl、酚磺乙胺(止血敏)、VitC、生理盐水。混匀后,各取 100 μL 加入微柱凝胶卡(空白介质),专用离心机离心 5 min,观察结果;另取 4 组试管,将红细胞浓度改为 3%,再分别加入 100、200、300、400、500 μL 相应的溶液,混匀,离心 1 000 r/min,先肉眼观察,再混匀后取少量通过显微镜观察,记录为盐水介质

法结果;试管内余下液体,先加低离子液 0.6 mL,2 滴凝聚胺,混匀后 3 400 r/min 离心 10 s,去上清液,先肉眼观察有无凝集,无凝块的直接记录结果,有凝块的再加 2 滴解聚液,摇匀 60 s 内显微镜观察,记为凝聚胺结果。实验重复 3 次。

1.2.2 含特异性抗体 以 4 种溶液分别倍比稀释含相应抗体的血清,与相应抗原的红细胞进行免疫学反应。一共 4 组,每组试管 8 支,依次为 KCl、酚磺乙胺(止血敏)、VitC、生理盐水。本次试验选用含抗 A 血清与 A 抗原红细胞为例,将抗 A 血清分别以相应的 4 种稀释液进行 1:1、1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8 倍稀释,各取稀释后的液体 50 μL 加入微柱凝胶卡(空白介质),再加入 A(+)1%红细胞 50 μL,专用离心机离心 5 min,观察结果;另取 8 支试管,编号后分别加入稀释好的血清 100 μL,每管另分别加入 A(+)3%红细胞 100 μL,直接 1 000 r/min 离心 1 min,先肉眼观察,再混匀后取少量通过显微镜观察,记录结果;试管内余下液体,先加低离子液 0.6 mL,2 滴凝聚胺,混匀后 3 400 r/min 离心 10 s,去上清液,先肉眼观察有无凝集,无凝块的直接记录结果,有凝块的再加 2 滴解聚液,摇匀 60 s 内显微镜观察结果。实验重复 3 次。

2 结 果

2.1 不含特异性抗体 微柱凝胶法:生理盐水组全部为阴性, KCl、酚磺乙胺(止血敏)、VitC 组全部为阳性凝集强度为±~1+。盐水介质法:4 组镜下均无凝集,酚磺乙胺(止血敏)组红细胞形态为小圆球,其他组均为典型两面凹的红细胞形态。凝

聚胺介质法: KCl、酚磺乙胺(止血敏)、VitC 组的前 1~3 管加入低离子溶液及凝聚胺后可见红细胞非特异性凝集,第 4~5 管均无凝集,取前 1~3 管加入解聚液后, KCl 与 VitC 组非特异性凝集消失,酚磺乙胺(止血敏)组凝集不能消失,镜下可见小块凝集,为少量红细胞周围包裹有类似结晶样物质。生理盐水组加入低离子液及凝聚胺有非特异性凝集,加入解聚液后凝集消失。

2.2 含特异性抗体 微柱凝胶法:全部为阳性,其中 KCl 组凝集强度为 1+,酚磺乙胺(止血敏)、VitC、生理盐水组为 4+。盐水介质法:酚磺乙胺(止血敏)、生理盐水组 1~8 管肉眼均可见小凝块, VitC 组显微镜下均有凝集, KCl 组第 1~5 管显微镜下有凝集,6~8 管均无凝集,酚磺乙胺(止血敏)组红细胞形态为小圆球,其他均为典型两面凹的红细胞形态。凝聚胺介质法:4 组液体加入低离子液及凝聚胺均有非特异性凝集,加入解聚液后凝集不能消失,相对直接离心镜检法,各组凝集强度均增强。

3 讨 论

交叉配血试验是确定能否输血的重要依据,阴性表明患者与供者血液之间没有检出不相配合的抗原抗体成分^[2]。常用检测方法有盐水介质法,凝聚胺介质法及微柱凝胶法。药物 VitC、KCl 及止血敏是临床常用药物,使用过药物的患者血样本也可能送检实验室,在检验工作人员无法预知药物存在的情况下,了解 3 种药物对抗原抗体反应的影响是非常有必要的。

本次实验中,模拟了两种可能存在的情况,第一种情况,当患者体内不含有相应红细胞特异性抗体时,理论上 3 种方法交叉配血试验结果均应为无溶血、无凝集,简称为阴性。但在实验中发现,除了盐水介质法为阴性外,3 种药物对凝聚胺介质法与微柱凝胶法均有不同程度底的影响。对凝聚胺介质法的影响,药物含量较少时, KCl 与 VitC 对凝聚胺法检测无影响,止血敏有假凝集;当药物过多时,加入低离子溶液与凝聚胺后不能产生非特异性凝集,使凝聚胺法实验失败。对微柱凝胶法影响较大,虽然不含相应特异性抗体,全部会产生微弱或 1+ 的凝集。

另一种可能情况下,如果患者体内存在相应红细胞特异性抗体,本研究发现凝聚胺介质交叉配血法不受药物影响。但是对盐水法与微柱凝胶法有影响,在盐水介质法中,生理盐水组、止血敏组、VitC 组均有凝集,区别在于凝集强度略有差异;生理盐水组与止血敏组有肉眼可见凝集, VitC 组只可见镜下凝集;而 KCl 组随着抗体被稀释,凝集强度减弱甚至于消失。微柱凝胶法中生理盐水组、止血敏组、VitC 组均有 4+ 凝集, KCl 组凝集强度为 1+。

探讨出现这些反应差异的原因,首先需要了解 3 种交叉配血方法的实质。交叉配血本质是凝集反应,其中盐水介质主要检测 IgM 类抗体,多见于 ABO 血型不合。操作简单、不需要特殊试剂,但是不能有效地防止免疫性溶血和非溶血性输血反应的发生^[3]。本研究亦发现有特异性抗体存在的条件下,盐水法的凝集强度较凝聚胺方法低。

凝聚胺介质配血法利用低离子介质与凝聚胺试剂,可以同时检出 IgM 与 IgG 两种性质的抗体,包括可引起溶血性输血反应的绝大多数抗体。缺点在于检测 Kell 抗体缺乏足够的敏感性^[4],偶有漏检可能无重要临床意义时 IgM 抗体^[5],结果观察带有一定主观性^[6],肝素降低反应敏感度^[7],止血敏、高浓度 KCl 和 VitC 可阻止红细胞与特异性抗体结合等。本次试验亦发现加入过多的药物会使凝聚胺试验失败,与田建

良^[8],林庆芳等^[1]报道相同。分析原因应是 KCl、VitC、止血敏药物在水溶液中带有负电荷,能使红细胞的 Zeta 电位上升,增加红细胞之间的排斥力^[9],但林庆芳等^[1]报道使用过量的凝聚胺可以消除药物的影响。本实验室也曾遇 1 例凝聚胺配血与微柱凝胶配血法明显不符的标本,后经临床用药分析并结合加入过量凝聚胺试验证实,为使用大量止血药物所致。同时,本研究发现无特异性抗体存在条件下,止血敏组加解聚液后非特异性凝集不能消失,通过显微镜高倍镜下观察,为少量红细胞周围包裹有类似结晶样物质,且红细胞形态变为圆球形,推测与止血敏致血小板聚集作用相关,而红细胞形态的变化未见其他类似报导,尚不能确定止血敏在人体是否会导致同样的红细胞变化。另一方面,当含特异性抗体时,如果药液量浓度不高,实验有效的情况下,凝聚胺介质法凝集强度较盐水法明显,说明凝聚胺介质方法敏感性是优于盐水介质配血法的。

微柱凝胶是在凝胶介质中让红细胞抗原与相应抗体结合,通过调节凝胶的浓度来控制凝胶间隙的大小,只允许游离的红细胞通过,再通过离心作用,从而区分凝集与未凝集红细胞^[10]。交叉配血的凝胶卡通常含有抗球蛋白试剂,能同时检测 IgM 与 IgG 两种性质的抗体。在交叉配血试验中,对不规则抗体的检测有很大的优势^[11]。微柱凝胶法要优于凝聚胺法^[12]。但是试验受红细胞悬液浓度、纤维蛋白、细菌污染、红细胞膜因素等影响^[10]。本研究中,在不含特异性抗体时,除生理盐水外,含其他药物的凝胶卡中均出现弱凝集,可以得出结论:(1)弱凝集的出现与 3 种药物导致溶液渗透压改变相关;(2)微柱凝胶卡对红细胞的要求比较高,不新鲜、保存不当或其他原因导致红细胞膜破坏的血样均会影响微柱凝胶法的结果。本研究的另一个发现是, KCl 溶液可以减弱抗原抗体在凝胶中的结合,推测与 KCl 改变了溶液的离子强度有关。

综上所述,低浓度的 VitC、KCl 不影响凝聚胺介质配血,止血敏令试验产生假凝集;高浓度的 3 种药物可导致试验失败。盐水介质法检测敏感性较其他两种方法略低, VitC、KCl 对结果的影响不明显,而 KCl 组随着抗体被稀释,凝集强度减弱甚至于消失。3 种药物对微柱凝胶配血法均有影响,尤其受 KCl 影响较大。

本研究设计只是模拟两种可能的药物存在方式,而人体是一个复杂的大环境,药物在体内的代谢也是一个复杂的过程,通过此设计只能简单了解药物对交叉配血试验的某些影响,特定情况还得结合临床具体分析。

参考文献

- [1] 林庆芳,邱威. 药物 VitC、KCl 及止血敏对凝聚胺交叉配血试验的影响[J]. 检验医学与临床,2009,6(18):1565.
- [2] 胡丽华. 临床输血检验[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010:55.
- [3] 杨世明,杨彬林. 凝聚胺试验与常用检测不完全抗体方法的敏感性比较[J]. 第四军医大学学报,2000,21(4):64-65.
- [4] Letendre PL, Williams MA, Ferguson DJ. Comparison of a commercial hexadimethrine bromide method and low-ionic-strength solution for antibody detection with special reference to anti-K [J]. Transfusion,1987,27(2):138-141.
- [5] Fisher GA. Use of the manual polybrene test in the routine hospital laboratory[J]. Transfusion,1983,23(2):152.
- [6] 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):432-434.
- [7] 练正秋,宣景秀. 肝素抗凝剂对凝聚胺交叉配血(下转第 597 页)

中,加入 100 μ L 乙腈,混匀 30 s,然后置于-4 $^{\circ}$ C 10 min,在高速冷冻离心机上以 13 000 r/min 离心 20 min,离心结束取出静置 20 min,移取 10 μ L 样品上清液,按照标准品标准操作步骤进行衍生化处理。

2 结 果

2.1 标准品分离图谱 17 种氨基酸标准品完全分离,峰型比较对称,基本上没有杂峰干扰,说明在此条件下能够得到良好的分离,色谱图见图 3(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。

2.2 血清样品分离图谱 血清样品中氨基酸完全分离,有部分峰有干扰,但对于目标峰来说没有影响,血清中 17 种氨基酸对应的色谱图见图 4(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。

2.3 精密度试验 取健康人血清样品从衍生反应开始重复 10 次,以外标法定量测定各氨基酸浓度,批内精密度范围为 2.81%~7.35%;一日内分 6 批测定,计算批间精密度,范围为 7.44%~15.40%。结果见表 2。

表 2 精密度试验结果

氨基酸	批内			批间		
	x	s	CV%	x	s	CV%
His	3.21	0.11	3.40	1.69	0.13	7.91
Ser	9.46	0.27	2.81	8.44	0.97	11.48
Arg	7.50	0.34	4.55	7.49	0.86	11.50
Gly	17.53	1.07	6.11	12.44	1.38	11.12
Asp	1.81	0.10	5.40	1.48	0.23	15.40
Glu	9.11	0.52	5.76	8.12	1.07	13.21
Thr	7.67	0.32	4.13	7.23	0.82	11.33
Ala	32.33	1.82	5.64	28.95	3.56	12.28
Pro	13.00	0.63	4.84	12.67	1.44	11.36
Cys	2.86	0.21	7.35	1.40	0.17	12.45
Lys	11.15	0.63	5.67	11.27	0.99	8.77
Tyr	4.74	0.20	4.17	4.23	0.54	12.77
Met	1.37	0.06	4.35	1.64	0.20	12.27
Val	17.22	0.71	4.10	16.89	1.54	9.12
Ile	4.47	0.17	3.79	4.46	0.34	7.51
Leu	9.12	0.34	3.71	8.77	0.65	7.44
Phe	5.82	0.18	3.11	5.70	0.44	7.65

2.4 线性范围试验 按照 1.2.3 配制好不同浓度的标准品溶液,以浓度为横坐标(X),对应的峰面积为纵坐标(Y),绘制标准曲线,17 种氨基酸的线性回归方程及相关系数见表 3(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”),在 2.5~250 μ mol/L 范围内线性良好,相关系数为 0.996 0~1.000 0。平行测定 6 次相对标准偏差小于 3%。

(上接第 595 页)

试验的干扰 2 例[J]. 中国输血杂志,2003,16(4):284.

[8] 田建良, KCL 和 VitC 对凝聚胺法交叉配血试验的干扰[J]. 中国输血杂志,2003,16(2):98.

[9] 武建. 凝聚胺法交叉配血的干扰及影响[J]. 临床血液学杂志, 2008,21(2):98-99.

[10] 杨世明, 田榆, 张勇萍, 等. 微柱凝胶法交叉配血试验及其影响因

3 讨 论

血清中常见游离氨基酸有 20 种,本方法所购置的标准品是 17 种混合标准液,标准品溶解在盐酸溶液中,而色氨酸在酸性环境下易被破坏,可将色氨酸在碱性溶液中进行稀释,然后进行衍生化处理,单独建立校正曲线。

批间精密度试验中有些氨基酸变异较大,可能与样品的保存、衍生的温度、酸碱度等条件的变化相关,因此控制实验条件的一致性对结果的重现性具有重要作用。针对样品本身基质的复杂性一定要控制好其保存条件,在条件允许下,可以进行几个不同温度下保存,对照处理,验证其结果的稳定性,以确定最优保存条件。

目前国内外采用高效液相色谱仪分析氨基酸的方法有很多,但大多操作繁琐,分析条件要求苛刻,且耗时较长,导致结果报告时间很长。本文应用 AQC 柱前衍生反相超高效液相色谱法仅用 10 min 即可成功分离血清中 17 种游离氨基酸,建立了 17 种氨基酸的定量方法。衍生化处理步骤比较简单,试剂用量少、灵敏度高、分析时间短、基线波动小、稳定性好,是准确、快速、稳定、可靠的氨基酸分析方法。

参考文献

[1] Cabooter D, Wuyts B, Desmet G, et al. Variable column length method development strategy for amino acid analysis in serum samples of neonates with metabolic disorders[J]. J Chromatogr A,2013,1292(1):229-238.

[2] 周政华, 杨元, 洪君蓉, 等. 固相萃取-离子色谱-积分脉冲安培法测定人血清中游离氨基酸[J]. 分析化学研究简报,2007,35(7):1063-1066.

[3] 张露蓉, 江国荣. DABS-Cl 柱前衍生 RP-HPLC 法定量测定血清中游离氨基酸[J]. 苏州大学学报,2004,20(3):65-71.

[4] 赵剑虹, 杨柳桦, 李永新, 等. 柱前衍生-高效液相色谱法测定大熊猫血清中 18 种游离氨基酸[J]. 分析试验室,2007,26(11):15-19.

[5] 边春香, 孙志红, 李莉, 等. 反相高效液相色谱法测定血清中的游离氨基酸[J]. 色谱,2005,23(3):317.

[6] Tcherkas YV, Kartsova LA, Krasnova IN. Analysis of amino acids in human serum by isocratic reversed-phase high-performance liquid chromatography with electrochemical detection[J]. J Chromatogr A,2001,913(1/2):303-308.

[7] Armstrong M, Jonscher K, Reisdorph NA. Analysis of 25 underivatized amino acids in human plasma using ion-pairing reversed-phase liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry [J]. Rapid Commun Mass Spectrom,2007,21(16):2717-2726.

[8] Bunk DM, Lowenthal MS. Isotope dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry for quantitative amino acid analysis [J]. Method Mol Biol,2012,828(1):29-38.

(收稿日期:2013-11-08)

素的探讨[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2007,23(8):780-781.

[11] 赵领军. 用 ROC 曲线评价纸板法凝聚胺法与微柱凝胶法在血型抗体测定中的作用[J]. 山西医药杂志,2010,39(11):1137.

[12] 危艳顺, 姚明. 凝聚胺法、微柱凝胶法两种配血方法学评价[J]. 临床和实验医学杂志,2013,12(8):623-624.

(收稿日期:2013-11-14)