

• 论 著 •

T 淋巴细胞亚群检验血标本在 18~28 ℃ 温室或 4 ℃ 冰箱过夜与当日标本检验结果对比研究*

姚伯程¹, 王 芳¹, 田彩平¹, 包晓玲², 李永辉³, 庞 洁⁴

(1. 甘肃省医学科学研究院分子生物学研究中心, 甘肃兰州 730050; 2. 甘肃省肿瘤医院肿瘤内科, 甘肃兰州 730050; 3. 甘肃省医学科学研究院转化医学中心, 甘肃兰州 730050; 4. 甘肃省肿瘤医院检验科, 甘肃兰州 730050)

摘要: 目的 为了解决血标本在采集后 4 h 内检验限制和确保检验结果的准确性, 同时满足患者和临床医生的需求, 对 T 淋巴细胞亚群检验血标本的不同存放时间、存放温度条件的检验结果与标准方法进行对照研究。方法 抗凝管中的抗凝血一半当日检验, 另一半标本置于 18~28 ℃ 温室或 4 ℃ 冰箱过夜, 于次日再测定。检验方法用实用单克隆抗体 SPA 花环 (McAb-A-E) 直接法。结果 用 20 例标本对比结果, 用 SPSS19.0 统计软件, 经配对 *t* 检验对检验结果进行处理分析, 两组 CD3 (*t*=-1.025, *P*=0.318)、CD4 (*t*=-1.468, *P*=0.159)、CD8 (*t*=-1.408, *P*=0.175)、CD4/CD8 (*t*=-0.481, *P*=0.636) 比较, 四项结果的差异均无统计学意义 (*P*>0.05)。结论 抗凝血标本在 18~28 ℃ 温室或 4 ℃ 冰箱过夜, T 淋巴细胞亚群检验结果与当日相比无变化, 即并不影响淋巴细胞 CD3、CD4、CD8 抗原性, 也不影响实用 McAb-A-E 直接法对其抗原性的测定。

关键词: T 淋巴细胞亚群检验; 实用 McAb-A-E 直接法; 标本过夜保存; 淋巴细胞 CD3、CD4、CD8 抗原性

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2015.09.016 文献标识码:A 文章编号: 1673-4130(2015)09-1203-02

Comparative study between overnight storage of blood samples under room temperature of

18~28 ℃ or 4 ℃ and same day samples in detecting T lymphocyte subsets *

Yao Bocheng¹, Wang Fang¹, Tian Caiping¹, Bao Xiaoling², Li Yonghui³, Pang Jie⁴

(1. Molecular Biology Research Center, Gansu Academy of Medical Sciences, Lanzhou, Gansu 730050, China;

2. Departments of Oncology, Gansu Provincial Tumor Hospital, Lanzhou, Gansu 730050, China;

3. Transformation Medicine Center, Gansu Academy of Medical Sciences, Lanzhou, Gansu 730050, China;

4. Departments of Clinical Laboratory, Gansu Provincial Tumor Hospital, Lanzhou, Gansu 730050, China)

Abstract: Objective To conduct the comparative study on the detection results between different storage time and different storage temperature with the standard method conditions for storing the specimens in the detection of T lymphocyte subsets in order to solve the detection restriction within 4 h after specimen collection and at the same time meet the demands of clinical doctors and patients. **Methods** The half of anti-coagulation blood in anti-coagulation tube was detected at the same day. Another half was stored under the room temperature of 18~28 ℃ or 4 ℃ in refrigerator for overnight and detected on the next day. The practical McAb-A-E direct method was adopted for conducting the detection. **Results** The detection results of 20 specimens were compared and performed the processing analysis by using SPSS13.0 statistical software and paired *t* test. Comparing the results of CD3 (*t*=-1.025, *P*=0.318)、CD4 (*t*=-1.468, *P*=0.159)、CD8 (*t*=-1.408, *P*=0.175)、CD4/CD8 (*t*=-0.481, *P*=0.636) in the two groups, the differences had no statistical significance (*P*>0.05). **Conclusion** The anticoagulant specimens are stored overnight at room temperature of 18~28 ℃ or 4 ℃ in refrigerator, the detection results of T lymphocyte subsets have no change compared with the detection at the same day, which does not affect the antigenicity of lymphocytes CD3, CD4 and CD8, also does not affect the antigenicity determination by using the practical McAb-A-E direct method.

Key words: T-lymphocyte subsets test; practical McAb-A-E direct method; specimens overnight storage; lymphocytes CD3, CD4, CD8 antigenicity

T 淋巴细胞亚群检验是判断人体细胞免疫功能的主要指标之一。而单克隆抗体 SPA 花环 (McAb-A-E) 直接法因主要试剂冻干抗体致敏红细胞花环试剂具有特异性强、敏感, 不需使用特殊仪器, 仅需普通光学显微镜即可等优越性, 二十多年来被临床医学实验室和相关研究单位广泛应用。但是, 也有其检验方法本身和被检标本存放时限的限制, 一部分标本不能及时采集和检验, 使得实验室操作者、患者和临床医生都不能满足需要。为此, 对血标本 18~28 ℃ 温室或 4 ℃ 冰箱过夜与当日检验结果对比研究, 现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 McAb 血球试剂 WuT3 0.5 mL; McAb 血球试剂

WuT4 0.5 mL; McAb 血球试剂 WuT8 0.5 mL。按说明书配制。汉克氏平衡盐溶液 pH 7.0~7.4, 分析纯 (AR) 试剂, 双蒸水配制 (本研究中未加酚红指示剂)。肝素钠抗凝管 5 mL (血流变、生化类测定)。乙二胺四乙酸二钾盐 (EDTA-K2) 抗凝管 2 mL (血常规用), 淋巴细胞分离液 (生化试剂) 250 mL, 瑞氏粉 0.5 g, 姬姆萨氏粉 2 g, 碱性美兰粉 0.5 g, 将上述成分加 10 mL 甘油 (丙三醇), 在玻璃研钵中不断研磨并逐渐加入甲醇使之完全溶解, 补加甲醇稀释至 500 mL 备用。在汉克氏平衡盐溶液 100 mL 中加入新生小牛血清 20 mL, 混匀, 在超净台分装在无菌青霉素小瓶或小离心管中, 每管 1~2 mL, 置冰箱冷冻箱中冷冻保存。

* 基金项目: 2010 年甘肃省自然科学基金项目 (1010RJZA144)。

作者简介: 姚伯程, 男, 副主任检验师, 主要从事免疫学和微生物学检验研究。

1.2 仪器与试剂 淋巴细胞分离液(生化试剂)由中国医学科学院血液学研究所提供。水平式离心机(离心半径 22 cm) LDZ5-2 低速自动平衡离心机由北京医用离心机厂提供; 显微镜 Olympus CH 型由日本 Olympus 公司提供。

1.3 方法

1.3.1 外周血单个核细胞(PBM)制备 用淋巴细胞分离液法分离, 用无钙、镁 Hank'S 液洗涤(5~10 倍体积)2 次, 用 20% 新生小牛血清的汉克氏平衡盐溶液配成 400~600 万/mL PBMC 悬液备用。置于 4℃ 的标本从冰箱取出后, 标本要恢复至温室后才能分离单个核细胞, 否则, 因温度对分离有影响, 导致分离细胞失败。18~28℃ 过夜标本可直接分离淋巴细胞。单个核细胞的分离用比重(1.075)淋巴细胞分离液低速(800~1 200 r/min)分离。

1.3.2 抗凝血标本存放方法 血标本采集于抗凝管中, 送到实验室后, 混匀, 用无菌滴管吸取一半于另一试管中, 作为当日测定标本; 抗凝管中的另一半标本置于 18~28℃ 温室或 4℃ 冰箱过夜, 于次日再测定。

1.3.3 T 淋巴细胞亚群检验方法 用实用 McAb-A-E 直接法^[1-2]。

1.4 统计学处理 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS19.0 统计软件对检验结果进行配对 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

将 20 例置于 18~28℃ 温室或 4℃ 冰箱的过夜临床标本的 CD3、CD4、CD8、CD4/CD8 四项指标与当日标本进行对照研究, 经 *t* 检验发现, 四项指标的差异均无统计学意义($P > 0.05$)。结果详见表 1。

表 1 18~28℃ 温室或 4℃ 冰箱过夜标本与当日标本
检验结果对比($\bar{x} \pm s$)

标本类型	n	CD3(%)	CD4(%)	CD8(%)	CD4/CD8
当日标本	20	54.40 ± 20.82	34.20 ± 10.48	35.10 ± 12.84	1.07 ± 0.41
18~28℃/4℃ 过夜标本	20	56.40 ± 20.48	35.70 ± 12.04	36.20 ± 12.12	1.09 ± 0.41
<i>t</i>		-1.025	-1.468	-1.408	-0.481
P		0.318	0.159	0.175	0.636

3 讨 论

在应用 McAb-A-E 直接法对人外周血中的淋巴细胞表面抗原 CD3、CD4、CD8、CD4/CD8 进行检测的早期, 一般的规定是在血标本采集后的 2~4 h 进行检验。然而在临幊上, 患者就医的时间往往是随机的, 因此临幊医生对患者的有些实验室检查也随着患者的不定时而难以定时。T 淋巴细胞亚群是检验患者免疫功能的重要指标, 尤其是肿瘤患者。而机体的免疫功能很容易因受到化疔药、放射线、免疫增强剂、抑制剂和其他各种药物等的影响发生变化。因此, 临幊医生希望得到患者就醫用藥前或者能尽可能早得到 T 淋巴细胞亚群的检验结果, 便于制定诊疗方案。但 T 淋巴细胞亚群检验方法本身(实验需要连续操作 7~8 h, 不包括读片)的限制, 使得早上 9 点以后就诊的门诊患者或需要此项检验的其他患者的标本不能及时采集。

为了解决血标本在采集后 2~4 h 之内检验受限制和确保检验结果的准确性, 同时满足患者和临幊医生的需求, 对 T 淋巴细胞亚群检验血标本的不同存放时间、存放温度的检验结果与标准方法进行对照研究, 希望既能对 T 淋巴细胞亚群检验血标本在一定温度条件下延长保存时间, 又能保证检验结果的准确性。血标本采集于抗凝管中, 送到实验室后, 混匀, 用无菌

滴管吸取一半于另一试管中, 作为当日测定标本; 抗凝管中的另一半标本置于 18~28℃ 温室或 4℃ 冰箱过夜, 于次日再测定。置于 4℃ 的标本从冰箱取出后, 标本要恢复至温室后才能分离单个核细胞, 否则, 因温度对分离有影响, 导致分离细胞失败。18~28℃ 温室过夜标本可直接分离淋巴细胞。单个核细胞的分离用比重(1.075)淋巴细胞分离液低速(800~1 200 r/min)分离。检验方法用实用 McAb-A-E 直接法。淋巴细胞表面抗原 CD3、CD4、CD8、CD4/CD8 检测结果的差异无统计学意义($P > 0.05$)。在实用 McAb-A-E 直接法中, 18~28℃ 温室或 4℃ 冰箱过夜标本与当日标本的检验结果一致, 说明抗凝血标本在 18~28℃ 温室或 4℃ 冰箱过夜, 并不影响淋巴细胞 CD3、CD4、CD8 抗原性, 也不影响实用 McAb-A-E 直接法对其抗原性的测定。

血标本在什么条件下存放仍能反映新鲜血液 T 淋巴细胞亚群, 也为很多学者所关心。Dzik 等认为全血 4℃ 存放 24 h 至 1 周, 其结果有显著改变。有学者也得出相似结果, 并报道先分离淋巴细胞, 22℃ 存放 24 h, 结果仅有轻度改变。有学者则提出不同见解, 认为全血 4℃ 存放过夜后, 淋巴细胞亚群结果并无变化, 只是由于粒细胞密度改变, 在分离 PBM 时混入了较多的粒细胞, 在使用间接荧光免疫法检查时, 非荧光细胞增加^[3-6]。

本研究使用的是 McAb-A-E 直接法, 细胞经改良姬姆萨染色液染色, 粒细胞、单核细胞和淋巴细胞在高倍镜下很易分辨, 故不存在间接免疫荧光法的缺点。

实验结果显示, 用实用 McAb-A-E 直接法检验 T 淋巴细胞亚群(CD3、CD4、CD8、CD4/CD8)时, 抗凝血标本在采集之后, 可以存放在 18~28℃ 温室或 4℃ 冰箱过夜, 即存放 24 h 后再进行检验, 检验结果与当日采集 4 h 之内标本的检验结果无统计学差异($P < 0.05$)^[7]。一般的实验室都是在当日上午 9 h 左右开始检验工作, 最迟的标本也必须在 9 h 以前送达实验室。而 9 h 以后至下午下班前需要检验的标本, 只要符合空腹抽血的条件, 都可以随时抽取送实验室保存, 次日进行检验^[8-9]; 可以满足次日开始用藥治疗、和常规检验一同抽血、提前出院离开的患者, 既能满足患者需求, 又能满足临幊医生的需求。

参考文献

- [1] 姚伯程. 单克隆抗体 SPA 红细胞花环法检验淋巴细胞亚群的方法. ZL 200710018523.9[P]. 2009-12-12.
- [2] 姚伯程. 单克隆抗体 SPA 红细胞花环法检验淋巴细胞亚群的间接法. ZL 200710199298.3[P]. 2009-10-6.
- [3] 卫生部医政司. 全国临床检验操作规程[M]. 3 版. 南京: 东南大学出版社, 2005: 381-384.
- [4] 姚伯程. 免疫学研究新进展及动态[J]. 甘肃医药, 2011, 30(12): 725-728.
- [5] 王红洲, 姚伯程. 实用 McAb-A-E 直接法在诊断血液性疾病细胞免疫功能中的应用[J]. 甘肃医药, 2013, 32(9): 698-699.
- [6] 姚伯程. 实用 McAb-A-E 直接法简化操作缩短试验周期的实验研究[C]. 中国免疫学会第九届免疫学学术大会论文集(山东济南), 2014, 10. 18-10. 21: 655.
- [7] 马斌荣. 医学统计学[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2001.
- [8] 姚伯程, 王怡云. 分离液对 T 细胞阳性花环和非 T 细胞阳性花环计数结果影响的研究[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 30(1): 1-2.
- [9] 郁爱华, 田文斌, 姚伯程. EDTA 抗凝剂在 McAb-A-E 直接法实用新方法中的应用研究[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(3): 455.