

# 一种改良的红细胞渗透脆性试验方法

梁兴东, 韦延安, 黎华连

(广西壮族自治区柳州市人民医院 545001)

**摘要:**目的 对传统红细胞渗透脆性试验进行操作步骤改进, 并对两种方法检测结果一致性进行验证。方法 直接配制 14 种低渗 NaCl 溶液, 并分装, 试验时取分装好的 NaCl 溶液进行检测。结果 取 80 例标本, 用改良法和传统方法进行比对, “开始溶血”项中两种方法检测结果相同 78 例(97.50%), “完全溶血”项中两种方法检测结果相同 77 例(96.25%)。两种方法检测结果不同标本经复查后完全相同。结论 可以用改良法替代传统方法进行红细胞渗透脆性试验。

**关键词:**红细胞; 渗透脆性; 方法

**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2012.10.042

**文献标识码:**A

**文章编号:**1673-4130(2012)10-1237-02

红细胞渗透脆性试验<sup>[1]</sup>是检测红细胞对不同浓度低渗盐溶液的抵抗力, 用于遗传性球形红细胞增多症、遗传性椭圆形红细胞增多症<sup>[2]</sup>、自身免疫性溶血性贫血、阻塞性黄疸等疾病的诊断及珠蛋白生成障碍性贫血(旧称:地中海贫血)的筛查<sup>[3-9]</sup>。传统方法在每次试验前需将某一浓度高渗 NaCl 溶液用蒸馏水稀释成多管低渗溶液进行测定, 操作较为繁杂, 容易出现操作失误。作者在不改变试验原理前提下将该方法操作步骤进行改进(以下将改进的方法称为改良法)取得良好效果。

## 1 资料与方法

表 1 改良法红细胞渗透脆性试验 NaCl 溶液配制表

项目	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
NaCl(g)	0.50	0.48	0.46	0.44	0.42	0.40	0.38	0.36	0.34	0.32	0.30	0.28	0.26	0.24
蒸馏水(mL)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
浓度(g/L)	5.0	4.8	4.6	4.4	4.2	4.0	3.8	3.6	3.4	3.2	3.0	2.8	2.6	2.4

1.2.2 将上述每种浓度 NaCl 溶液用试管分装, 每管 2 mL, 加盖密闭, 防止水分挥发。同瓶 NaCl 溶液分装的试管编号与该瓶编号一致。

1.2.3 试验时用乙二胺四乙酸三钾(EDTA-K<sub>3</sub>)作为抗凝剂, 采集新鲜静脉血液, 静置使红细胞沉淀。取分装好的编号为 1~14 号 NaCl 试管各 1 支, 用微量吸管在标本红细胞层吸取 10 μL 红细胞, 分别加入上述试管中, 加盖堵住管口后轻轻上下颠倒混匀, 在室温中静置 2 h 后观察上清液颜色和管底沉淀。

1.2.4 结果判断, 开始溶血: 上清液开始呈现浅红色, 溶液下部分混浊, 管底有较多未溶解红细胞。完全溶血: 整管液体呈深红色, 无混浊, 试管底部未见红细胞。

1.3 标本来源 选取 80 例标本, 所选标本无凝集、溶血、黄疸等现象。为观察本试验对阳性标本检出情况, 在 80 例标本中特选取遗传性球形红细胞增多症(HS)3 例, 珠蛋白生成障碍性贫血 3 例, 缺铁性贫血 3 例, 脾切除术 2 例, 肝脏疾病 4 例。其他标本为随机选取。

1.4 比对试验 每天取 8 例标本并随机抽取两名实习人员, 其中一人用改良法进行试验, 另一人用《全国临床检验操作规程》第 3 版中《红细胞渗透脆性试验》方法进行试验, 共进行 10 d, 对 80 例标本检测结果进行方法学比对。

## 1.1 材料

1.1.1 将 NaCl(分析纯)放入玻璃瓶中, 开盖置于 37 °C 恒温烤箱中烘烤, 充分去除水分。

1.1.2 取一批 12 mm×75 mm 玻璃管洗净烤干。

1.1.3 取 14 个容量为 250 mL 三角烧瓶, 洗净置于恒温箱中烤干。

## 1.2 方法(用于改良法)

1.2.1 将 14 个三角烧瓶依次编号, 用分析天平准确称量 NaCl, 按表 1 所示配成各种浓度 NaCl 溶液。

## 2 结果

两种方法检测结果比对情况见表 2。

表 2 80 例标本用两种方法检测结果比对情况

项目	开始溶血		完全溶血	
	n	%	n	%
检测结果相同	78	97.50	77	96.25
检测结果不同	2	2.50	3	3.75
合计	80	100.00	80	100.00

## 3 讨论

红细胞渗透脆性试验检测的是红细胞对不同浓度低渗盐溶液的抵抗力<sup>[10]</sup>。检测结果越大说明红细胞抵抗力越小, 则渗透脆性越大; 反之抵抗力增大, 渗透脆性降低。

本研究结果显示, 80 例标本中“开始溶血”项中两种方法检测结果相同 78 例(97.50%), “完全溶血”项中两种方法检测结果相同 77 例(96.25%)。本研究又对检测结果不同标本再次用两种方法认真细致复查, 复查后发现用传统方法复查结果与第一次测试结果均有变化, 用改良法复查结果与第一次测试结果完全相同, 各标本复查后两种方法检测结果完全相同。

改良法基本原理与传统方法是一样的,在操作无失误的情况下两种方法检测数据高度一致。但传统方法是先配制一种储存液(高渗溶液),试验时再将其稀释成 12~14 种低渗溶液,稀释步骤繁琐,且稍不注意就有可能稀释错误,导致结果判断错误。而改良法一次性准确配制好各种浓度低渗溶液,试验时无需再稀释,既杜绝了失误,又简化了操作流程,从而确保检验结果准确,完全可以替代传统方法。试剂厂家亦可根据本改良法制成商品试剂盒,在各级检验机构中进行销售,从而更加有利于红细胞渗透脆性试验的规范性操作。

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,2006:168-169.

[2] 张碧红,陈纯,岑丹阳,等. 遗传性球形红细胞增多症 26 例[J]. 实用儿科临床杂志,2008,23(15):1162-1164.

[3] 贾冰,林志芳,纪新梅. 常用筛查方法在地中海贫血诊断中的临床应用[J]. 检验医学与临床,2010,7(13):1339-1340.

[4] 陈冬,李萍,荣卡彬. 地中海贫血筛查实用技术的应用研究[J]. 中

国优生与遗传杂志,2008,16(6):39-41.

[5] 何雅军,杨小华,马福广,等. 红细胞平均体积和脆性及血红蛋白电泳联合检测在地中海贫血诊断中的价值[J]. 中华检验医学杂志,2005,28(3):244-246.

[6] 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应用评价[J]. 海南医学,2004,15(4):15-17.

[7] 孙扭君,李汉金,王秀云,等. MCV 和红细胞脆性试验在地中海贫血筛查中的诊断价值[J]. 中国优生与遗传杂志,2007,15(8):115-116.

[8] 李长钢,石红松,王纓,等. MCV 及红细胞渗透脆性试验在诊断地中海贫血的临床价值[J]. 中华现代儿科学杂志,2004,1(3):210-212.

[9] 陈加力,区丽群. 地中海贫血患者血液 MCV、MCH、RDW 及红细胞脆性试验的探讨[J]. 现代检验医学杂志,2004,19(4):32-33.

[10] 谭齐贤. 临床血液学和血液检验[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社,2005:112.

(收稿日期:2011-10-08)

• 检验技术与方法 •

## 荧光定量聚合酶链反应在淋球菌检测中的应用评价

王晓莉<sup>1</sup>, 江秀娟<sup>2</sup>

(1. 兰州电机厂职工医院检验科; 2. 甘肃省肿瘤医院检验科, 兰州 730050)

**摘要:**目的 以淋球菌 porA 假基因为靶序列,建立灵敏度高,且特异性强的荧光定量(FQ)聚合酶链反应(PCR)检测方法。方法 以淋球菌 porA 假基因为靶序列设计引物和探针,在实时荧光 PCR Master Mix 基础上优化 PCR 反应体系和方法,并评价方法的灵敏度、特异性和稳定性等。结果 经评估表明该法特异性和敏感性均为 100.0%,灵敏度较高,达到检测淋球菌小于 50 CFU/mL 的检测限;批间和批内检测变异系数均小于 5%。结论 以淋球菌 porA 假基因为靶序列建立 FQ-PCR 检测方法,灵敏度高,特异性强,且稳定性好,适合于作为淋病临床实验室辅助诊断和淋球菌阳性结果的确诊方法。

**关键词:**奈瑟球菌,淋病; 聚合酶链反应; porA 假基因

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.10.043

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)10-1238-03

淋病是一种极容易传染和重复感染的性病,易出现合并症及后遗症。据 WHO 估计全球每年新发病例超过 6 000 万<sup>[1]</sup>。淋病临床实验室诊断方法的“金标准”是分离培养法,但培养法假阳性率高,且灵敏度低,不利于早期诊断和快速筛查<sup>[2]</sup>。荧光定量(FQ)聚合酶链反应(PCR)实现了 PCR 从定性到定量的飞跃,以其特异性强、灵敏度高、重复性好、定量准确、速度快、全封闭反应降低污染等优点成为分子生物学研究的重要工具。该技术已被应用于病原体检测、肿瘤基因检测、基因表达分析等多个医学研究领域<sup>[3-4]</sup>。本研究旨在应用 FQ-PCR 技术,以淋球菌 porA 假基因为靶序列,建立灵敏度高,且特异性强的新型检测方法。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 常见奈瑟菌属 ATCC 标准株购自 ATCC,包括淋球菌(ATCC31426、ATCC49226、ATCC19424)、乳酰胺奈瑟菌(ATCC23970)、脑膜炎奈瑟菌(ATCC13077、ATCC13090)、黏液奈瑟菌(ATCC49233)、干燥奈瑟菌(ATCC29193)、微黄色奈瑟球菌(ATCC14799)、浅黄奈瑟菌(ATCC 13115)和灰色奈瑟菌(ATCC14685)等。临床分离株

由兰州电机厂职工医院、甘肃省肿瘤医院检验科收集、分离和鉴定,细菌采用分离培养及生化方法鉴定,病毒采用有 SFDA 医疗器械批号的核酸或免疫学检测试剂盒鉴定,其中淋球菌 40 株,脑膜炎奈瑟菌 5 株,灰色奈瑟菌 1 株,多糖奈瑟菌 1 株,乳糖奈瑟球 2 株,沙眼衣原体 3 株,解脲原体 5 株,人乳头瘤病毒(HPV)18 型阳性样本 3 份,HPV 16 型阳性样本 4 份,HPV 11 型阳性样本 2 份,HPV 6 型阳性样本 2 份,单纯疱疹病毒(HSV)1 型阳性样本 2 份,HSV 2 型阳性样本 4 份,大肠埃希菌 2 株,金黄色葡萄球菌 3 株和沙门菌属 2 株。120 例疑似淋病患者用棉拭子采集分泌物后冻存于 -70 ℃。

**1.2 仪器与试剂** Wizard 基因组 DNA 纯化试剂盒购自 Promega 公司,实时荧光 PCR Master Mix(For Taqman)试剂盒购自 TOYOBO 公司,ABI 7500 FQ-PCR 仪购自美国 ABI 公司。

### 1.3 DNA 的提取

**1.3.1 标准菌株及临床分离株 DNA 分离、纯化** 使用 Promega 公司 Wizard 基因组 DNA 纯化试剂盒,按照产品说明书操作,分离、纯化 DNA。

**1.3.2 临床样本 DNA 的提取** 将含有分泌物的棉拭子在 2