

• 临床检验研究论著 •

尿沉渣分析仪红细胞质控液的制备与分析*

王 帆, 刘 平, 蔡晓钟, 胥文春[△]
(重庆医科大学检验医学院, 重庆 400016)

摘 要:目的 探讨尿沉渣分析仪红细胞质控液的制备方法。方法 以 0.05%、0.10%、0.15%、0.20% 戊二醛浓度对洗涤红细胞进行全固定, 以 0.005%、0.010%、0.015% 戊二醛浓度进行半固定, 再分别用 PBS 和添加 Na₂SO₄ 的 PBS 稀释至不同浓度, 观察红细胞计数结果波动情况及质控液红细胞黏附尿沉渣分析仪计数板的情况。结果 与 UF-500i 质控液相比, 全固定与半固定红细胞质控液半年内的稳定性都很好, 但全固定红细胞容易黏附计数板, Na₂SO₄ 则可减少细胞黏附; 半固定红细胞不易黏附计数板, 且低浓度红细胞以及高浓度醛固定对提高红细胞的稳定性有一定作用。结论 半固定红细胞质控液比全固定红细胞质控液更适合临床应用。

关键词: 尿分析; 红细胞; 质量控制

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.18.004

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)18-2185-02

Development and analysis of erythrocyte quality control material for urinary sediment analyzer*

Wang Fan, Liu Ping, Cai Xiaozhong, Xu Wenchun[△]

(Department of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: **Objective** To develop erythrocyte quality control material for urinary sediment analyzer. **Methods** Washed fresh red blood cells(RBC) were totally fixed by glutaraldehyde with final concentrations of 0.05%, 0.10%, 0.15% and 0.20% respectively, while partially fixed with 0.005%, 0.010% and 0.015% glutaraldehyde, which were both diluted at different proportion with PBS buffer and PBS buffer added with Na₂SO₄ respectively. The number of RBC was measured by hematology analyzer, and the situation of RBC adhering on the counting chamber in urinary sediment analyzer was observed. **Results** Both total and partial fixed RBC were stable in half year. In partial fixed material, relatively higher glutaraldehyde concentration contributed to the stabilization of RBC. Compared with UF-500i quality control liquid, totally fixed erythrocytes were more likely to adhere on the counting chamber, however, it could be inhibited by Na₂SO₄. Partial fixed erythrocyte adhering on counting chamber was not observed. **Conclusion** Partial fixation method for preparing RBC quality control material might be more suitable for clinical application than total fixation method.

Key words: urinalysis; erythrocytes; quality control

尿沉渣分析仪是临床尿液分析常用设备, 需采用质控液对其工作状态进行监测。本研究针对目前国产质控液存在的红细胞稳定性不佳及细胞黏附计数板等问题, 在制备红细胞质控液过程中观察了不同戊二醛固定浓度、不同红细胞保存浓度及在保存液中添加 Na₂SO₄ 等对红细胞稳定性和黏附性的影响^[1-2]。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 XY-L-530 多管架自动平衡离心机(湘仪离心机公司)、TZL-5001 水平摇床(苏州珀尔西瓦实验设备有限公司)、POCH-100i 血细胞分析仪(日本 Sysmex 公司)、US-2025A 尿沉渣分析仪(重庆天海医疗设备有限公司)。0.85% 医用氯化钠溶液(四川盛康药业有限公司)、25% 戊二醛溶液(AR 级, 上海宝曼生物科技有限公司)、PBS(上海阳光试剂有限公司)、硫酸钠(AR 级, 重庆北碚化学试剂厂)、UF-500i 质控液(日本 Sysmex 公司)。

1.2 方法

1.2.1 全固定红细胞质控液的制备 取新鲜血液, 生理盐水洗涤 6 次后稀释成 10% 红细胞悬液; 将其加入戊二醛生理盐水溶液中, 戊二醛终浓度为 0.006 25%, 摇床 100 r/min 振摇 10 min; 分装 4 瓶后分别加入戊二醛生理盐水溶液, 至戊二醛

终浓度为 0.05%、0.10%、0.15%、0.20%, 摇床 120 r/min 振摇 30 min, 4℃ 放置 12 h 后以 120 r/min 振摇 30 min, 2 000 r/min 离心 5 min, 去上清, 用 PBS 和 PBS1(Na₂SO₄ 替代 PBS 成分中的 KCl, 保持一定渗透压^[3]) 作为保存液, 分别将离心后的红细胞稀释至压积为 1/80、1/120、1/160, 混匀后分装至 1.5 mL EP 管, 4℃ 保存。

1.2.2 半固定红细胞质控液的制备 取新鲜血液, 生理盐水洗涤 6 次后稀释成 33% 红细胞悬液; 将其分装成 3 瓶, 分别加到戊二醛生理盐水溶液中, 戊二醛终浓度依次为 0.005%、0.010%、0.015%, 充分混匀 30 s, 5 min 后 1 800 r/min 离心 10 min, 去上清, 再用生理盐水洗涤 4 次, 去上清(此步骤要求在 15 min 内完成); 用 PBS 和 PBS1 分别将离心后的红细胞稀释至压积为 1/80、1/120、1/160, 混匀后分装至 1.5 mL EP 管, 4℃ 保存。

1.2.3 稳定性分析 将半固定、全固定红细胞质控液及 UF-500i 质控液, 每隔一段时间用 POCH-100i 血细胞分析仪计数红细胞。

1.2.4 细胞黏附性分析 采用 US-2025A 尿沉渣分析仪对全固定、半固定红细胞质控液及 UF-500i 质控液进行测量, 记录仪器计数板上出现细胞黏附时的检测次数。

* 基金项目: 重庆医科大学学生创新实验项目(201117)。 △ 通讯作者, E-mail: xuwen0303@126.com。

2 结 果

2.1 稳定性分析 与 UF-500i 质控液相比,全固定与半固定红细胞质控液在半年内稳定性较好(见图 1)。全固定红细胞质控液中,PBS1、低浓度红细胞及较高浓度戊二醛对提高红细胞计数结果稳定性没有显著作用(见图 2~4)。半固定红细胞质控液中,与 PBS 相比,PBS1 对提高红细胞计数结果稳定性无显著影响(见图 5),但低浓度红细胞与高浓度戊二醛对提高其稳定性有一定作用(见图 6~7)。

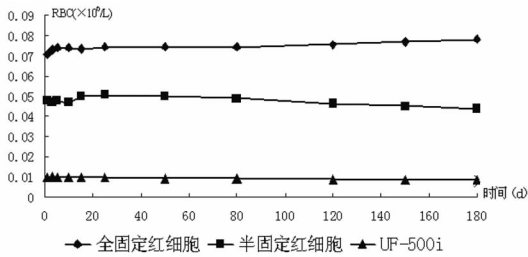


图 1 稳定性分析

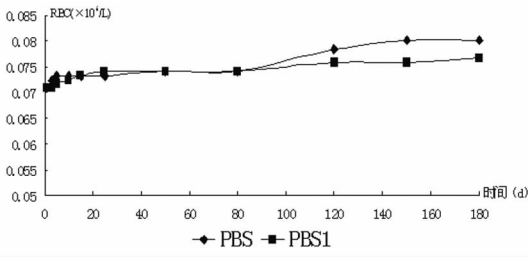


图 2 保存液对全固定红细胞质控液红细胞稳定性的影响

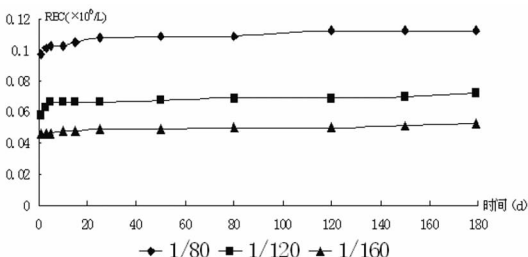


图 3 红细胞浓度对全固定红细胞质控液红细胞稳定性的影响

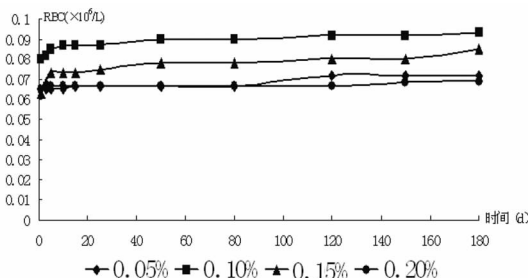


图 4 戊二醛浓度对全固定红细胞质控液红细胞稳定性的影响

2.2 细胞黏附性分析 全固定红细胞质控液中,随机选取第 6 管(固定浓度 0.05%、红细胞压积 1/160、PBS1 保存)、第 21 管(固定浓度 0.20%、红细胞压积 1/160、PBS1 保存)、第 24 管(固定浓度 0.20%、红细胞浓度 1/160、PBS 保存)进行尿沉渣分析仪检测,计数板出现细胞黏附时的平均检测次数分别为 54、37、23 次,说明戊二醛固定浓度增高时,较易出现细胞黏

附,而 Na_2SO_4 对细胞黏附计数板具有一定抑制作用。半固定红细胞质控液中,随机选取第 6、12、15、16、17、21、24 管,经过多次检测,仪器计数板上未出现细胞黏附。UF-500i 质控液经过多次检测,仪器计数板上亦未出现细胞黏附。

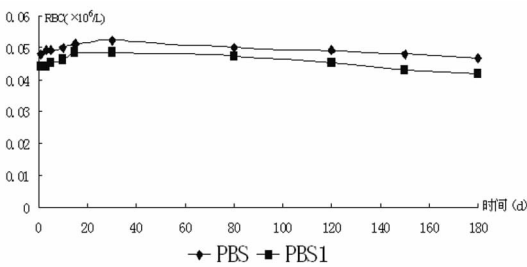


图 5 保存液对半固定红细胞质控液红细胞稳定性的影响

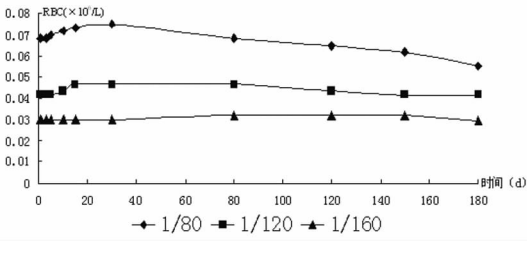


图 6 红细胞浓度对半固定红细胞质控液红细胞稳定性的影响

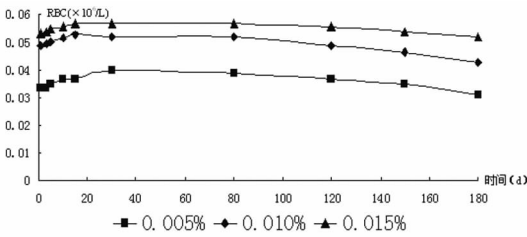


图 7 戊二醛浓度对半固定红细胞质控液红细胞稳定性的影响

3 讨 论

红细胞的保存主要采用醛化固定的方法,其原理是醛类物质可以固定红细胞膜蛋白,增强红细胞耐渗透压和抗机械损伤的能力,从而延长红细胞保存期^[4]。但醛液浓度较低时红细胞固定不完全,易在运输过程中损伤,难以长期保存;醛液浓度较高则易造成红细胞黏附尿沉渣分析仪计数板。为此,本试验比较了醛液浓度较高的全固定与醛液浓度较低的半固定方法。结果显示与 UF-500i 质控液相比,两种方法制备的质控液红细胞计数结果稳定性较好。全固定红细胞质控液中,戊二醛固定浓度均较高,红细胞固定完全,计数结果稳定性很好;半固定红细胞质控液中,低浓度红细胞以及相对较高的戊二醛固定浓度可提高计数结果稳定性。

红细胞经醛化固定后硬度增加,变形能力下降,黏附性增加,导致红细胞黏附仪器计数板,影响检测结果准确性^[5-11]。资料显示, Na_2SO_4 可以通过提高比重而防止细胞黏附^[12]。所以本试验在 PBS 中添加 Na_2SO_4 ,以观察其对红细胞黏附仪器计数板的影响。全固定红细胞质控液黏附性分析结果提示,较高的戊二醛固定浓度会增加计数板上的细胞黏附, Na_2SO_4 则可减少细胞黏附。半固定红细胞质控液戊二(下转第 2188 页)

曲线下面积为 0.962(95%CI 0.925~0.999, $P<0.01$)。血清 LTI 预测 AMI 的灵敏度为 90.9%,特异度为 98.4%,阳性预测值为 98.6%,阴性预测值未 89.5%,比值比(OR)为 32.5,约登指数为 0.893。

3 讨 论

由于生活水平的提高和生活环境的改变,心血管疾病已成为威胁人民健康、影响人民生活质量的重大疾病^[5]。AMI 是冠心病的危急症候,是中老年人群的常见病和多发病。该病起病急、病死率和致残率很高^[6]。冠状动脉粥样硬化病变是心肌梗死的基本病因,其发生机制是冠状动脉的易损斑块破裂、血栓形成,导致心肌缺血冠状动脉的分支堵塞,使一部分心肌失去血液供应而坏死。目前国内外大量研究表明脂质代谢紊乱已经成为动脉粥样硬化的主要危险因素,其中血清 TC、TG 和 LDL-C 升高和(或)HDL-C 降低是已经明确的独立危险因子,但以上指标受人种和环境因素的影响较大^[7-8],因此寻找更有效的风险预测因子越来越多受到研究人员的关注。

2006 年,Rajappa 等^[9]提出在 2 型糖尿病人群中,LTI 是心血管疾病重要的风险预测因子。本研究以辽宁沈阳 AMI 患者为研究对象,探讨 LTI 与 AMI 发生的关系。结果表明,AMI 患者 LTI 高于对照组,预测 AMI 发生的灵敏度达到 90.9%,特异度达到 98.4%,阳性预测值为 98.6%,阴性预测值为 89.5%,OR 为 32.5。LTI 结合了 TG、TC、HDL-C 和 Lp(a)四个指标,可大大减少单独测定中的变异影响,其性能优于单项指标。在后续的研究中,将扩大样本量,将多种影响心血管疾病的因素纳入研究范围,例如:研究对象空腹血脂指标的个体差异;AMI 发生后,血脂发生应激性变化,临床测定血脂水平往往偏低,不能反映患者实际的脂质代谢紊乱^[10];AMI 发生后采血时间。

综上所述,将 LTI 应用于日常生活,作为预防动脉粥样硬化和冠心病的重要监测指标,可以降低冠心病事件的发生率,

使更多的人获益。

参考文献

[1] Abu-Omar Y, Tsui SS. Mechanical circulatory support for AMI and cardiogenic shock[J]. J Card Surg, 2010, 25(4): 434-441.

[2] 李建珍,刘春江. 急性心肌梗死的新生标志物[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(2): 188-191.

[3] Lin LY, Chen JJ, Lee CH, et al. Incidence and predictors of sudden death in patients having myocardial infarction-A population-based investigation in Taiwanese[J]. Int J Cardiol, 2012, 157(3): 439-440.

[4] 李文锋,张振林,禰彩云,等. 某地区健康体检人群血脂水平调查[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(15): 1732-1734.

[5] 蔡心安. 超敏 C-反应蛋白检测在心血管疾病中的临床应用[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(19): 2230-2233.

[6] 姚涛,吴达军. 50 例心肌梗死患者血液流变学指标与血脂的分析[J]. 江西医药, 2011, 46(6): 524-525.

[7] Manolio T. Novel risk markers and clinical practice[J]. N Engl J Med, 2003, 349(17): 1587-1589.

[8] Hajer GR, van der Graaf Y, Bots ML, et al. Low plasma HDL-C, a vascular risk factor in high risk patients independent of LDL-C [J]. Eur J Clin Invest. 2009, 39(8): 680-688.

[9] Rajappa M, Sridhar MG, Balachander J, et al. Lipoprotein(a) and lipid tetrad index as a marker for coronary artery disease in NIDDM patients in South India[J]. Clin Chim Acta, 2006, 372(1/2): 70-75.

[10] Kashinakunti SV, Kollur P, Kallaganada GS, et al. Comparative study of serum MDA and vitamin C levels in non-smokers, chronic smokers and chronic smokers with acute myocardial infarction in men[J]. J Res Med Sci, 2011, 16(8): 993-998.

(收稿日期:2012-02-12)

(上接第 2186 页)

醛固定浓度较低,即使保存液中不加入 Na₂SO₄ 也不易出现细胞黏附。

综上所述,全固定红细胞与半固定红细胞半年内的稳定性都很好,但全固定红细胞容易出现黏附计数板的情况,所以半固定红细胞更适合临床应用。

参考文献

[1] 王一选,陈伯伦,谢为,等. 猪全血细胞质控物的研究及应用[J]. 实用医技杂志, 2007, 14(23): 3132-3133.

[2] 黄胜,梁华英. 稀释液渗透压降低对血细胞检测的影响分析[J]. 实用医技杂志, 2004, 11(3): 321-322.

[3] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS-GL03 能力验证样品均匀性和稳定性评价指南[S]. 北京:中国合格评定国家认可委员会, 2006.

[4] 赵捷,王彩云. 尿液有形成分保存方法的研究[J]. 河北医科大学报, 2003, 24(6): 367-368.

[5] 向甄,杨继庆,文峻. 红细胞变形性的影响因素及测量方法[J]. 中国医学物理杂志, 2006, 23(6): 423-426.

[6] Serro AP, Colao R, Saramago B. Adhesion forces in liquid media:

effect of surface topography and wettability[J]. J Colloid Interface Sci, 2008, 325(2): 573-579.

[7] Svetina S, Zihlerl P. Morphology of small aggregates of red blood cells[J]. Bioelectrochemistry, 2008, 73(2): 84-91.

[8] Chambers E, Mitragotri S. Long circulating nanoparticles via adhesion on red blood cells: mechanism and extended circulation[J]. Exp Biol Med(Maywood), 2007, 232(7): 958-966.

[9] Glenister FK, Fernandez KM, Kats LM, et al. Functional alteration of red blood cells by a megadalton protein of plasmodium falciparum[J]. Blood, 2009, 113(4): 919-928.

[10] Evans J, Gratzer W, Mohandas N, et al. Fluctuations of the red blood cell membrane: relation to mechanical properties and lack of ATP dependence[J]. Biophys J, 2008, 94(10): 4134-4144.

[11] Musielak M. Red blood cell-deformability measurement: review of techniques[J]. Clin Hemorheol Microcirc, 2009, 42(1): 47-64.

[12] 熊立凡,刘成玉. 临床检验基础[M]. 北京:人民卫生出版社, 2007: 9-14.

(收稿日期:2012-03-09)