

泡间气体交换障碍,组织缺氧,反射性兴奋呼吸中枢,呼吸加深加快,CO₂ 排出增加,不同程度改变了碳酸氢根/碳酸缓冲系统平衡,氢离子减少,pH 值升高^[1]。PHD 常常是由肺部基础疾病加重,气管狭窄或阻塞,肺泡内压增高,压迫肺毛细血管,肺通气和换气功能障碍,动脉血 PO₂ 降低,PCO₂ 增高,产生过多的氢离子,pH 值降低。本研究发现,呼吸困难时 CHF 有轻微碱血症,部分患者呈缺氧状态,随着呼吸加深加快,易形成低碳酸血症。而 PHD 组呈酸血症,缺氧要甚于 CHF 组,PCO₂ 明显增高,造成 CO₂ 潴留。当然,还是否存在代谢性酸碱紊乱,需结合血气分析其他参数综合分析。

NT-proBNP 主要来源于心室肌细胞。当心室容积扩张,心室压力负荷过重,心源性激素前体 proBNP 被释放出来,后被分解为等量有活性的 BNP 和无活性的 NT-proBNP。与 BNP 相比,NT-proBNP 半衰期长,稳定性好,心衰时血浆浓度升高幅度大,与 BNP 有良好的相关性^[2]。本研究发现,发生呼吸困难时,CHF 患者血浆 NT-proBNP 水平显著升高,并且波动幅度大,进一步证明了血浆 NT-proBNP 水平与心衰严重程度密切相关,有利于心功能分级,治疗监测与预后评估。PHD 患者急性期血浆 NT-proBNP 也有一定程度升高。缺氧、高碳酸血症和呼吸性酸中毒是形成肺动脉高压的重要因素^[3]。由于肺动脉动高压时,肺血管阻力增加,右心室后负荷增加,右心室舒张功能不全,这些都可能是肺心病患者血浆 NT-proBNP 升高的原因,参与了 PHD 的病理和生理变化。

大量研究证实,血小板在血栓形成和心脑血管疾病的发病机制中发挥重要作用。血小板参与血栓形成的基础是血小板活化^[4]。活化血小板形态结构也会发生改变,血小板被激活后消耗大量血小板,刺激骨髓巨核细胞增生,新生大血小板释放入血,导致血小板异质性增大。MPV 增高可反映血小板活化功能,是发生心脑血管疾病的危险因素^[5-6]。体积大的血小板含有较多的 α 颗粒,使颗粒中的 5-羟色胺和 β 血栓蛋白等物质

释放增多,血小板黏附功能增强,易发生聚集,加速血栓形成^[7]。本研究结果显示,急性发作时,2 组患者 MPV,PDW、P-LCR 均有不同程度升高,尤其 CHF 患者升高明显。提示血小板参数升高幅度越大患者血小板代谢更加活跃,活性增强,血栓栓塞事件和猝死风险明显升高。因此,观察 MPV,PDW、P-LCR 参数,可反映血小板活化程度,有助于鉴别高危患者,预防血栓栓塞事件,具有重要临床意义。

综上所述,本研究表明血气,NT-proBNP 及血小板参数能反映 CHF、PHD 患者的呼吸功能和心功能状态,有效评估血栓栓塞事件的风险。发生呼吸困难时,联合检测这些指标,对充血性心力衰竭和肺源性心脏病的鉴别诊断具有重要价值。

参考文献

[1] 段培芹,冯培青.慢性心力衰竭病人酸碱失衡及电解质紊乱的观察[J].齐鲁医学杂志,2002,17(3):249.
 [2] 陈阵,孙国华,孙芹敏,等.NT-proBNP 在呼吸困难鉴别中的应用研究[J].临床军医杂志,2011,39(1):129-131.
 [3] 马爱群,李岩.内科学[M].北京:人民卫生出版社,2001:21.
 [4] 许文荣,王建中.临床血液学与检验[M].4 版.北京:人民卫生出版社,2008:382-384.
 [5] 张向峰,刘双,宋扬,等.血小板参数对急性肺血栓栓塞症诊断及预后评估价值的研究[J].中国全科医学,2012,15(13):1472-1474.
 [6] 李国静,余良芳,罗春华,等.182 例冠心病患者血小板检测结果分析[J].陕西医学杂志,2010,39(8):1065-1067.
 [7] 闫伟,李斌,张周良,等.探讨血小板相关参数变化及 D-二聚体对诊断脑梗死的临床意义[J].中国血液流变学杂志,2010,20(4):658-659.

(收稿日期:2013-03-28)

实验室自制试剂红细胞用于血液检测的探索

徐志华¹,韦翔²,张汉东²,黄宏亮¹,陶慧²

(1.盐城市中心血站,江苏盐城 224005;2.盐城市第三人民医院检验科,江苏盐城 224000)

摘要:目的 研究试剂红细胞培养液的配制、保存红细胞的效果以及用于血液检测的可行性。方法 采用微量板法、试管法等血清学方法作反定型试验,观察培养液配制的红细胞在保存期间的变化和试验中的应用效果。结果 自制试剂红细胞在 4℃ 下可保存 15~16 周,室温下可保存 18 d。目前微量板法 ABO 反定型试验例数已经累计为 59 887 例,检出不规则抗体和异常血型 5 例,其中发现不规则抗体抗-M 3 例和 A3、CiSAB 血型各 1 例,未发现血型定型错误。结论 自制试剂红细胞培养液能够满足细胞培养的要求并在实际血型检测工作中得到应用。

关键词:红细胞; 培养液; 试管法; 微量板法

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.22.065

文献标识码:B

文章编号:1673-4130(2013)22-3074-02

试剂红细胞培养液的研究一直是比较热的话题,笔者从事血型血清学工作多年,摸索出了行之有效的试剂红细胞培养液的配制方法并将其应用于实际工作,现报道如下。

1 材料与与方法

1.1 材料 献血者无溶血的血浆标本(每毫升全血中加入 2.5 mg EDTA 钠盐抗凝),运输符合冷链要求,置于 4℃ 冰箱保存。抗-A、-B、-D、-C、-c、-E、-e 抗血清及抗人球蛋白试剂由上海市血液中心提供。

1.2 主要试剂

1.2.1 培养液的配制 葡萄糖、枸橼酸、枸橼酸三钠、EDTA 钠盐、肌苷、腺嘌呤、缓冲盐等适量加蒸馏水溶解后用 NaOH 调整 pH 至 6.8,抑菌剂为氯霉素和硫酸新霉素^[1]。

1.2.2 对照液的配制 生理盐水(NS)、AS-3 营养保存液自配^[2],商品化试剂红细胞培养液为 RSS(批号 20120321、20120714),均在有效期内。

1.2.3 试剂红细胞悬液 3 人以上 A、B、O 健康(各项传染病指标合格)献血者新鲜的同型红细胞混合,用 NS 洗涤 2 遍,以相应的红细胞培养液洗涤 1 遍,制成压积红细胞(3 000 r/min

离心 30 min),再配成所需浓度,储存于 4 ℃ 冰箱备用。

1.3 方法 采用微量板法进行检测。3%~5%浓度试剂红细胞悬液 30 μL 与血浆 50 μL 置于 96 孔 U 型微量板中混匀,加样采用全自动加样仪(Microlab Star 全自动样本处理系统),Hettich 平板式离心机(1 500 r/min)离心,再置于 TS 温控孵育振荡仪 4 min,结果用肉眼观察或酶标仪-计算机系统(Anthos HT III 自动扫描酶标仪,波长 620 nm,支持软件 AUSLAB 为北京澳斯邦公司产品)判读并打印结果,依据 AUSLAB 软件结构,微量板经扫描后每孔都可获得一最小透光率(Tn)和最大透光率(Tm)。非凝集孔 Tm 与 Tn 的差值 Tc 较小,凝集孔 Tc 值较大,当 Tc 值超过一特定值时,提示细胞凝集,反之,Tc 值较小时表明细胞不凝集。

2 结 果

2.1 4 ℃ 下红细胞保存效果 分别取保养液及对照液配制的献血者红细胞悬液 4 份于 4 ℃ 储存且定期肉眼观察,红细胞出现溶血或发黑时间:自制保养液中为:15~16 周,NS 中为 3~6 d,其余保养液中为 6~14 周,按照临检操作规程^[3],每隔 1 个月测定保养液中红细胞游离血红蛋白含量,发现在保存期间血红蛋白含量低于 60 mg/L,红细胞在 16 周内肉眼观察未出现溶血或发黑现象,在显微镜下观察,红细胞未发生自聚。

2.2 室温红细胞保存效果 分别取保养液及对照液配制的献血者红细胞悬液 2 份于室温储存且每天肉眼观察:自制保养液中红细胞 19~24 d 出现溶血,NS 中的 1~2 d 溶血,其他对照液 12~16 d 出现溶血。

2.3 保养液保存的红细胞抗原在储存期间的变化 取献血者新鲜红细胞,用保养液配成悬液,4 ℃ 保存,采用盐水法、抗人球蛋白法定期检测抗-A、-B、-D、-C、-c、-E、-e 抗血清效价,未发现显著差异。

2.4 实际应用 自 2011 年 2 月至 2013 年 3 月,将保养液配制的 A、B、O 型试剂红细胞,常规供应本站和市内其他医院检验科,检出不规则抗体和异常血型 5 例,不规则抗体抗-M 3 例,A3、CiSAB 血型各 1 例。目前微量板法 ABO 反定型试验例数已经累计为 59 887 例,未发现血型定型错误。

2.5 微量板法最佳试验条件的确定 根据参考文献^[4],选择 5%红细胞浓度为最适工作浓度。孵育条件由时间、振频、振幅三方面决定,在反定型试验中,根据温控孵育振荡仪的性能设计了三因素三水平的正交试验进行孵育^[5],最终得出每个试验的 Tc 差值,见表 1(见《国际检验医学杂志》网站“论文附件”),可见最佳孵育条件为孵育时间 4 min,振频 400 r/min,振幅 3 级。悬浮条件主要考虑两方面因素,即非凝集红细胞的充分悬浮和弱凝集反应不至于振频过大时消失,经三因素三水平的正交试验对悬浮条件进行优化(见表 2)(见《国际检验医学杂志》网站“论文附件”),同时满足完全悬浮和透光率 Tc 较低的有 5 种条件,本研究选取振频最小的条件,即悬浮时间 3 min,振频 900 r/min,振幅 3 级为最佳条件。最佳静置时间的选择:取一块微量板,加入人源抗 A 血浆 50 μL 和 5% A 红细胞 30 μL 或人源抗 B 血浆 50 μL 和 5% B 红细胞 30 μL,将形成强凝集的试验完成的微板,悬浮后于 0、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5 min 分别判读结果,显示 3 min 静置时间所产生的试验效果阴阳性结果差异最大,所以 3 min 的静置效果最佳。判读条件和 cutoff 值的确定:结果判读关键在于扫描点数的确定,Tc 差值越大,判读效果越佳,对具有强凝集的试验结果,进行不同扫描点数判读,采用优选法中黄金分割点法确定扫描点数,20 点扫描效果最好。该方法建立后,对 5 000 份献血员样品进行了反定

型,然后分别对阴、阳性 Tc 值的分布情况进行数理统计,见表 3。最终将 cutoff 值确定为:Tc<0.500 为阴性,可疑区域为 0.500≤Tc≤0.600;Tc>0.600 为阳性,可疑区域和误判孔数为 4/10 000,该 cutoff 值具有 99.96%的可靠性。

表 3 10 000 个阴、阳性 Tc 的分布情况(n)

Tc 值范围	阴性的分布情况	阳性的分布情况
0.000~0.300	3 675	0
>0.300~0.400	1 457	0
>0.400~0.500	42	0
>0.500~0.600	3	5
>0.600~0.700	0	48
>0.700~0.800	0	1 679
>0.800	0	3 091

3 讨 论

试剂红细胞保养液的研究国内外一直很热门^[6-8],也曾有多篇报道,但是将研制成功的保养液运用到血液检测实际工作中的相关报道甚少。按照补体活化途径,红细胞抗原与抗体结合后吸附并激活补体,引起溶血,补体的激活需要钙、镁离子参加^[9],笔者采用 EDTA 钠盐来络合钙、镁离子,防止补体被激活,并加入抗凝剂、抑菌剂、营养物质等,有效地延长了红细胞保存时间,增强了试验敏感性,同时将其与实际工作结合起来,运用到血液的检测中。

脂血、溶血、弱的血型抗体会影响反定型结果的判读,保养液配制的红细胞在反定型试验中敏感性高、特异性强,所有试验未出现假阳性,对于严重脂血、溶血、血型抗体较弱标本亦能检出。

实验室反定型试验条件的摸索,也同样适用于正定型试验,目前很多血站采用先进的全自动加样设备,可以逐步摸索出适合自己实验室的正、反定型的试验条件。

如果碰到 ABO 正反定型不符时,可以运用多种血清学方法和血型试剂,如吸收放散、唾液试验、抗人球蛋白法等来进一步确认是否有亚型、弱抗体和假凝集等存在。

参考文献

- [1] 柏乃庆. 血液保存[M]. 上海:上海科学技术出版社,1984:111-156.
- [2] 李勇,杨贵贞. 人类红细胞血型学实用理论与实验技术[M]. 北京:中国技术出版社,1999:232.
- [3] 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,1997:61.
- [4] 杨春森,孔令魁,叶贤林,等. ABO 反向定型微凝自动扫描法的研究[J]. 中国输血杂志,1997,10(1):12.
- [5] 陈平,邢振荣. 延胡索总生物碱提取与分析方法比较[J]. 中国现代应用药学,1993,10(6):15-16.
- [6] 孙爱农,吴晓燕,曹铁源,等. 一种新型试剂红细胞保养液的制备和应用[J]. 中国输血杂志,2002,15(6):394-396.
- [7] 何永勋. 保存液添加氨基酸对试剂红细胞保存时间的影响[J]. 中国输血杂志,2009,22(4):302-303.
- [8] 何永勋. 叠氮钠在试剂红细胞保存中的应用研究[J]. 中华现代临床医学杂志,2005,3(12):1200.
- [9] 刘达庄. 免疫血液学[M]. 上海:上海科学技术出版社,2002:17.