

放散试验室内质控方法的初步探讨*

赵家宁¹ 宋贺¹ 马峰² 刘月红¹

[摘要] 目的:建立一种简单有效、可在一般实验室使用的放散试验质控方法。方法:采用供者直接抗人球蛋白试验阴性、自身对照阴性、无免疫史的 O 型 RhD 阳性压积红细胞制备放散试验的阴性对照。采用不同稀释倍数的单克隆 IgG 型抗-D 致敏 O 型 RhD 阳性红细胞制备强阳性、弱阳性 2 个梯度的放散试验阳性对照。采用正交试验原理摸索制备阳性对照的最佳制备条件。评价该质控方法对酸、热放散 2 种常用方法的适用性。结果:筛选到未致敏的 O 型 RhD 阳性压积红细胞作为放散试验的阴性对照。强阳性对照的最佳制备条件:200 μL 未致敏的 O 型 RhD 阳性压积红细胞与 25 μL 的单克隆 IgG 型抗-D 原液在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 min。弱阳性对照的最佳制备条件:200 μL 未致敏的 O 型 RhD 阳性压积红细胞与等体积的 256 倍稀释的单克隆 IgG 型抗-D 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 min。该质控方法只适用于酸放散,不适用于热放散。结论:成功建立了适用于酸放散的室内质控方法。

[关键词] 室内质控;放散试验;自制质控物

doi:10.13201/j.issn.1004-2806-b.2020.08.004

[中图分类号] R457.1 [文献标志码] A

Preliminary discussion on internal quality control for elution test

ZHAO Jianing¹ SONG He¹ MA Feng² LIU Yuehong¹

(¹Department of Blood Transfusion, Xi'an No. 4 Hospital, Xi'an, 710004, China; ²Department of Blood Transfusion, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University)

Corresponding author: LIU Yuehong, E-mail: panpanjianing@163.com

Abstract Objective: To establish a simple and effective internal control strategy for elution test in general laboratories. **Method:** The negative control of elution test was prepared by O/RhD-positive packed red cells which were direct antiglobulin test negative, self-control negative and from donors without immune history. Two levels of positive controls were processed by different concentrations of IgG anti-D reagent. The optimal conditions for the preparation of positive controls were determined through orthogonal tests. And the internal control strategy was evaluated for both acid elution and thermal elution test. **Result:** The negative control of elution test was successfully obtained with non-sensitized O/RhD-positive packed red cells. The optimal conditions of strong positive control, 200 μL non-sensitized O/RhD-positive packed red cells were well incubated with 25 μL IgG anti-D reagent at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 1 min. The optimal conditions of weakly positive control, 200 μL non-sensitized O/RhD-positive packed red cells were well incubated with 200 μL diluted IgG anti-D reagent (dilution at a ratio of 1 : 256) at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 1 min. Our quality control method was applicable only to acid elution test, but not thermal elution test. **Conclusion:** An internal quality control strategy is successfully established for acid elution test.

Key words internal quality control; elution test; self-made controls

放散试验是输血检验工作中常用的实验方法,广泛应用于疑难血型、疑难配血、新生儿溶血病检测等临床工作中。输血相容性检测的室内质量控制(IQC)已在临床工作中广泛开展,既可以购买成品质控物,也可以实验室自制;而放散这一重要试验的质量控制却少有人问津。放散试验较输血相容性检测更精密,更容易受到测试环境、操作规范性等因素的影响,更需要做好质量控制工作。室内质量控制可及时发现试验各环节存在的误差,是确保检测结果准确、可靠的重要措施;而合理的设置阴、阳性对照则是简单、行之有效的室内质控实现

途径^[1-2]。现利用我实验室现有资源和条件,探索放散试验的室内质控方法。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

红细胞放散液试剂盒(快速酸放散法,珠海贝索生物技术有限公司);ABO、RhD 血型检测卡、低离子/抗人球蛋白卡(Bio-Rad 公司);医用离心机(长春博研科学仪器有限公司);孵育器、专用离心机(DiaMed GmbH);水浴恒温振荡器、水浴箱(西安英达医疗器械有限责任公司);单克隆抗-A、抗-B 试剂血清,单克隆 IgM 型抗-D、IgG 型抗-D 试剂、人 ABO 血型反定型用红细胞试剂盒、抗体筛选红细胞试剂、抗人球蛋白试剂均购自上海血液生物医药有限责任公司。

*基金项目:西安市第四医院科研孵化基金项目(No: FZ-44)

¹西安市第四医院输血科(西安,710004)

²西安交通大学附属第一医院输血科

通信作者:刘月红, E-mail: panpanjianing@163.com

1.2 阴、阳性对照的制备

1.2.1 阴性对照的制备 收集我院健康体检者的血液标本。体检者及其血样入选要求:①体检者无输血史、妊娠史及自身免疫疾病;②进行了肝功、输血前8项筛查,且其丙氨酸转氨酶(ALT)、HBsAg、抗-HCV、抗-HIV及梅毒抗体均符合《献血者健康检查要求》(GB 18467—2011)规定;③血液采集时间 ≤ 5 d的EDTA抗凝外周静脉血;④血型鉴定O型RhD阳性,直接抗人球蛋白试验以及自身对照试验阴性。收集符合以上要求的血样10人份混合,1 000 $\times g$ 离心5 min,弃去血浆,将得到的红细胞用生理盐水洗(1 000 $\times g$ 离心1 min)4次,尽可能吸尽末次上清,得到压积红细胞。取200 μ L压积红细胞进行放散试验,若结果为阴性,则取200 μ L压积红细胞作为阴性对照,剩余压积细胞(基础细胞)用于阳性对照的制备。

1.2.2 强阳性对照的制备方法及条件优化 强阳性对照由单克隆IgG型抗-D原液致敏上述基础细胞得到。为了得到最佳致敏条件,采用正交试验原理^[3]对红细胞与抗体混合比例、孵育时间2个实验条件进行摸索:将200 μ L基础细胞分别与10 μ L、25 μ L、50 μ L、100 μ L的IgG型抗-D在37 $^{\circ}$ C孵育1 min、15 min、30 min。再用生理盐水洗涤4次,得到的致敏压积红细胞作为强阳性对照。留末次洗涤液进行平行试验。

1.2.3 弱阳性对照的制备及条件优化 弱阳性对照由稀释后的单克隆IgG型抗-D致敏上述基础细胞得到。采用微柱凝胶卡式法检测单克隆IgG抗-D效价,选择64、128、256稀释倍数的IgG抗-D致敏基础细胞(以生理盐水进行稀释)。采用正交试验原理对红细胞与抗体稀释度、孵育时间2个实验条件进行摸索:200 μ L基础细胞与等体积的64、128、256稀释倍数的IgG抗-D分别在37 $^{\circ}$ C孵育1 min、15 min、30 min,再用生理盐水洗涤4次,得到的致敏压积红细胞作为弱阳性对照。留末次洗涤液进行平行试验。

1.3 不同放散方法的质控条件优化

1.3.1 酸放散 酸放散试验按照操作按说明书进行。一定体积的待检压积细胞与等体积的洗脱液轻轻混合均匀,室温下反应约15 s,立即以1 000 $\times g$ 离心1 min。离心完成后,迅速分离红细胞和上清液,用吸管吸取上清液转移入另1试管。在分离的上清液中滴入中和液,边滴边摇匀,液体颜色由黄色变为蓝色即可。再以1 000 $\times g$ 离心1 min,将上清液转移入另一试管,上清液即为放散液。取低离子/抗人球蛋白卡(用前离心),每孔加入50 μ L 1% O型RhD阳性红细胞悬液和25 μ L放散液(末次洗涤液亦为25 μ L),置于卡式孵育器离心15 min,立即放入卡式离心机85 $\times g$ 离心10 min,

观察记录结果。

1.3.2 热放散 热放散试验方法如下:取一定体积的待检细胞与等体积0.9%生理盐水混合,56 $^{\circ}$ C放散一定时间(离心套管一同孵育),1 000 $\times g$ 离心1 min保温离心得到上清液(放散液),取低离子/抗人球蛋白卡(用前离心),每孔加入50 μ L 1% O型RhD阳性红细胞悬液和25 μ L放散液(末次洗涤液亦为25 μ L),置于卡式孵育器15 min后,立即放入卡式离心机85 $\times g$ 离心10 min,观察记录结果。为了探讨阴、阳性对照最佳放散剂量和时间,采用正交试验原理分别采用200 μ L、500 μ L、1 mL 3种体积的压积细胞,56 $^{\circ}$ C放散1 min、3 min、5 min、10 min、15 min 5个时间梯度进行比较。

1.4 制备方法的稳定性评价

2位实验员按照以上最佳制备条件,连续20 d,每天分别制备强阳性、弱阳性、阴性对照各1份,与临床样本的放散试验同步检测,观察结果是否在控。阴、阳性对照放散结果要求标准:强阳性对照凝集强度为4+,弱阳性对照凝集强度为2+,阴性对照凝集强度为阴性。质控规则如下:阴性结果在阴性区域内,阳性结果在阳性区域内;凝集强度相差不大于 ± 1 级差为在控。

2 结果

2.1 酸放散试验强阳性对照的最佳制备条件

10 μ L、25 μ L、50 μ L、100 μ L的单克隆IgG型抗-D原液在3个孵育时间梯度下均可成功致敏O型RhD阳性红细胞,得到3+~4+的强阳性放散结果;末次洗液凝集强度为阴性。以抗体用量最少、孵育时间最短、凝集强度为4+的制备条件作为强阳性对照的最佳制备条件:200 μ L基础细胞与25 μ L的单克隆IgG型抗-D原液在37 $^{\circ}$ C孵育1 min。见表1。

表1 强阳性对照制备的抗体用量、孵育时间

| IgG型抗-D 试剂体积/ μ L | 孵育时间 /min | 直接抗人球蛋白 试验凝集强度 | 放散试验 凝集强度 |
|--------------------------|--------------|-------------------|--------------|
| 10 μ L | 1 | 1+ | 3+ |
| | 15 | 1+ | 3+ |
| | 30 | 1+ | 3+ |
| 25 μ L | 1 | 3+ | 4+ |
| | 15 | 3+ | 4+ |
| | 30 | 3+ | 4+ |
| 50 μ L | 1 | 3+ | 4+ |
| | 15 | 3+ | 4+ |
| | 30 | 3+ | 4+ |
| 100 μ L | 1 | 4+ | 4+ |
| | 15 | 4+ | 4+ |
| | 30 | 4+ | 4+ |

注:凝集强度检测采用微柱凝胶卡式法。

2.2 酸放散试验弱阳性对照的最佳制备条件

64、128、256 稀释倍数的 IgG 抗-D 致敏 O 型 RhD 阳性红细胞直接抗人球蛋白试验均阴性,但放散试验阳性。以凝集强度为 2+、孵育时间最短的制备条件作为弱阳性对照的最佳制备条件:200 μ L 基础细胞与 200 μ L 的 256 倍稀释的单克隆 IgG 型抗-D 在 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 min。见表 2。

表 2 弱阳性对照制备的抗体用量、孵育时间

| IgG 型抗-D 试剂稀释倍数 | 孵育时间 /min | 直接抗人球蛋白试验凝集强度 | 放散试验凝集强度 |
|-----------------|-----------|---------------|----------|
| 64 | 1 | — | 3+ |
| | 15 | — | 3+ |
| | 30 | — | 3+ |
| 128 | 1 | — | 3+ |
| | 15 | — | 3+ |
| | 30 | — | 3+ |
| 256 | 1 | — | 2+ |
| | 15 | — | 2+ |
| | 30 | — | 2+ |

注:凝集强度检测采用微柱凝胶卡式法。

2.3 阴、阳性对照制备方法的稳定性评价

2 位操作员连续 20 d 制备的阴、阳性对照,与临床样本的放散试验同步检测。酸放散试验结果均在控。阴性对照放散凝集强度均为 0,强阳性对照凝集强度均为 4+,弱阳性对照凝集强度在 1+~2+ 之间。

2.4 热放散试验

IgG 抗-D 致敏 O 型 RhD 阳性红细胞制备得到的强阳性对照,在多种条件下(强阳性对照的体积:200 μ L、500 μ L 和 1 mL,56 $^{\circ}$ C 放散 1 min、3 min、5 min、10 min、15 min 5 个放散时间梯度)的热放散结果均为阴性。

3 讨论

IQC 是确保实验室检测结果准确、决定常规报告能否发出的重要措施,采用适当的质控物则是开展 IQC 的物质基础。本研究利用基层医院的现有资源和条件,制备出适用于酸放散的强阳性、弱阳性、阴性 3 个水平的对照品。

制备方法的优势分析。本研究采用体检者的新鲜 EDTA 抗凝血样作为阴、阳性对照的细胞来源,制作成本低廉,来源广泛,可在各级别的医疗机构广泛应用。此外,为了增强结果的稳定性,选择可购买的、批量生产的、成分单一的单克隆 IgG 型抗-D 试剂致敏 O 型 RhD 阳性红细胞。通过摸索 IgG 型抗-D 与红细胞的体积比例、IgG 型抗-D 的

稀释梯度、孵育时间,得到强阳性和弱阳性对照的最佳制备条件。令我们没有想到的是,单克隆 IgG 型抗-D 与 O 型 RhD 阳性红细胞结合非常迅速,1 min 即可与 O 型 RhD 阳性红细胞结合,与孵育 15 min、30 min 得到的致敏细胞直接抗人球蛋白试验凝集强度无差异。单克隆 IgG 型抗-D 这样的高亲和力可以大大节约制备阳性对照的时间,提高工作效率,有利于该方法在繁忙的临床工作中开展。我实验室微柱凝胶法检测单克隆 IgG 型抗-D 效价为 256,说明上海血液生物医药公司的单克隆 IgG 型抗-D 很稳定,批间差异小,以该试剂制备阳性对照有利于本制备方法在不同实验室的推广和使用。

酸放散与热放散的适用性比较。酸放散试验中,不同操作员连续 20 d 的稳定性监测显示,阴性对照和强阳性对照凝集强度(微柱凝胶法)完全没有变化,稳定性非常好。而弱阳性对照凝集强度在 1+~2+ 之间,稳定性不如前两者,但也均在控制范围,可满足实验室对弱阳性对照的质量要求。所以,本研究制备的阴、阳性对照非常适合酸放散试验。而热放散实验中,将强阳性对照样本量从 200 μ L 增加到 1 mL,放散时间进行了 1 min、3 min、5 min、10 min、15 min 5 个梯度,放散液的凝集强度均为 0。由此可见,单克隆 IgG 型抗-D 致敏的红细胞并不适用于热放散,热放散不能将抗-D 从阳性对照上释放下来,这一结果超出了预期。虽然酸放散法效率高于热放散法^[4-5],但根据日常实践经验与刘玉敏报道^[6],多数来自患者致敏红细胞的抗-D 是可以通过热放散释放出来的。针对这一矛盾现象,分析如下:①患者体内的致敏红细胞是由外源性 D 抗原刺激机体产生的多克隆抗体,其与红细胞的亲和力相对较弱,可以被效率较低的热放散试验释放下来;而本研究制备的阳性对照是由经过筛选的、亲和力很高的单克隆 IgG 型抗-D 致敏的,因而热放散难以释放下来。②56 $^{\circ}$ C 时抗-D 被释放下来了,但在放散液的离心过程中又重新结合到红细胞表面(如表 1 所示,我实验在致敏条件的摸索中已经证实:单克隆 IgG 型抗-D 与 O 型 RhD 阳性红细胞结合只需要 1 min)。综上所述,由单克隆 IgG 型抗-D 制备的阳性对照适用于酸放散试验,不适用于热放散试验。

本研究利用基层医院的现有条件,对放散试验的室内质控模式进行了初步探讨,成功制备了强阳性、弱阳性、阴性 3 个水平的对照物,有助于输血科的精细化管理和室内质控的全面展开。本研究也有一定局限性:①只是建立了阴、阳性对照,与真正的质控品还有一定差距,需要进一步优化条件。②本研究的方法只适用于酸放散试验,需进一步探索适合热放散试验的质控方法。

阿奇霉素联合维生素 A 及甘草锌颗粒治疗肺炎支原体肺炎患儿的疗效分析*

缪伶俐¹ 刘金祥¹

[摘要] 目的:观察阿奇霉素联合维生素 A(Vit A)与甘草锌颗粒治疗肺炎支原体肺炎(MPP)患儿的临床疗效,及其对患儿血清中丙二醛(MDA)及免疫球蛋白(Ig)水平的影响。方法:选取 2017-08—2018-08 治疗的 MPP 患儿 102 例,按照随机数字表法分为对照组和观察组,每组 51 例。对照组患儿给予口服阿奇霉素干混悬剂,观察组在对照组基础上给予 Vit A 及甘草锌颗粒。比较 2 组患儿的疗效、白介素-6(IL-6)、白介素-8(IL-8)及肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、Vit A、锌(Zn)、MDA、IgA、IgG、IgM 及不良反应发生率。结果:观察组的有效率为 96.08%,明显高于对照组的 84.31%($P < 0.05$)。治疗前,2 组患儿 TNF- α 、IL-8、IL-6、Vit A、Zn、MDA、IgM、IgG、IgA 水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。治疗 2 周后,观察组的 IgM、IgG、IgA、MDA、TNF- α 、IL-8、IL-6 水平均低于对照组($P < 0.05$)。观察组的 Vit A 及 Zn 高于对照组($P < 0.05$)。2 组患儿不良反应发生率差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论:采用阿奇霉素联合 Vit A 与甘草锌颗粒治疗 MPP 患儿具有良好的临床疗效,可显著减轻患者体内的氧化反应,降低患者的炎症反应,调节机体的免疫功能,且安全性高。

[关键词] 阿奇霉素;维生素 A;甘草锌颗粒;肺炎支原体肺炎

doi:10.13201/j.issn.1004-2806-b.2020.08.005

[中图分类号] R375 **[文献标志码]** A

The therapeutic effect of azithromycin combined with vitamin A and glycyrrhiza zinc granules on children with mycoplasma pneumoniae pneumonia

MIAO Lingling LIU Jinxiang

(Department of Pediatrics, Rugao People's Hospital, Rugao, 226500, China)

Abstract Objective: To observe the clinical effect of azithromycin combined with vitamin A (Vit A) and glycyrrhiza zinc granule in the treatment of children with mycoplasma pneumoniae pneumonia (MPP) and its effect on the serum levels of malondialdehyde (MDA) and immunoglobulin (Ig) of children with MPP. **Method:** From August 2017 to August 2018, 102 children with MPP were randomly divided into control group ($n = 51$) and observation group ($n = 51$). In the control group, the oral azithromycin dry suspension was given, which was on the basis of Vit A and zinc licorice particles of the control group. The efficacy, interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8) and tumor necrosis factor- α (TNF- α), Vit A, zinc (Zn), MDA, IgA, IgG, IgM and the incidence of adverse events were observed in the two groups. **Result:** The effective rate of the observation group was 96.08%, which was significantly higher than that of the control group (84.31%) ($P < 0.05$). Before treatment, there was no difference in TNF- α , IL-8, IL-6, Vit A, Zn, MDA, IgM, IgG and IgA levels between the two groups ($P > 0.05$). After 2 weeks of treatment, the levels of IgM, IgG, IgA, MDA, TNF- α , IL-8 and IL-6 in the observation group were lower than those the control group ($P < 0.05$). Vit A and Zn in the observation group were higher than those of the control group ($P < 0.05$). There was no difference in the incidence of adverse events between the two groups ($P > 0.05$). **Conclusion:** Azithro-

*基金项目:国家卫生计生委医药卫生科技发展研究项目(No:W2016EWJS23)

¹如皋市人民医院儿科(江苏如皋,226500)

参考文献

- [1] 郑妍,王文婷,穆士杰,等.输血相容性检测试验室内质控品的制备与可行性分析[J].临床血液学杂志,2017,30(4):577-581,586.
- [2] 邱玉霞,李志平,孔莉娜,等.自制弱阳性质控品对无偿献血者进行 ABO 血型鉴定室内质控的可行性探讨[J].中国当代医药,2014,21(21):120-123.
- [3] 马印图,王更银,李玉秋,等.微柱凝胶技术检测血型抗体 IgG 亚型试验方法的建立[J].临床血液学杂志,2018,31(2):253-256.
- [4] 郑凌,刘衍春,吴敏慧,等. Gly-HCl/EDTA 放散法与 56°C 热放散法的试验比较[J].临床血液学杂志,2012,25(1):118-120.
- [5] 李静,陈保民.4 种放散方法解离免疫球蛋白 G 抗体效果比较[J].检验医学与临床,2015,12(13):1947-1949.
- [6] 刘玉敏. RhD 新生儿溶血病 D 抗原遮蔽的实验室诊断及治疗效果的观察[J].临床血液学杂志,2019,32(4):590-593.

(收稿日期:2020-01-08)