

自动细胞洗涤离心机在直接抗人球蛋白试验中的应用价值*

丁梦圆¹ 张辉¹ 周群刚² 吴子豪³

[摘要] 目的:探讨自动细胞洗涤离心机在直接抗人球蛋白试验(DAT)中的应用价值。方法:随机选取 20 份血样,同时使用传统手工法(手工组)和自动细胞洗涤离心机(机械组)制备洗涤红细胞,比较 2 组的洗涤时间、对 DAT 检测的干扰、上清液微量蛋白和红细胞浓度。结果:同时洗涤 2 个以上标本时,机械组所需时间短于手工组,差异有统计学意义($P < 0.05$);2 种洗涤方法均可避免血浆蛋白对 DAT 检测的干扰;2 组洗涤后上清液微量蛋白含量均较低,差异无统计学意义;但机械组洗涤后红细胞浓度较手工组显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论:应用自动细胞洗涤离心机制备洗涤红细胞,可提高实验操作效率、减少生物污染,值得在血清学实验室中推广。

[关键词] 自动细胞洗涤离心机;直接抗人球蛋白试验;洗涤红细胞

DOI:10.13201/j.issn.1004-2806.2022.12.010

[中图分类号] R555 [文献标志码] A

Application value of automatic cell washing centrifuge in direct anti-human globulin test

DING Mengyuan¹ ZHANG Hui¹ ZHOU Qungang² WU Zihao³

(¹Matching Laboratory, Suzhou Blood Center, Suzhou, 215006, China; ²Blood Collection Department, Suzhou Blood Center; ³Research Center, Suzhou Institute of Biomedical Engineering and Technology Chinese Academy of Sciences)

Corresponding author: WU Zihao, E-mail: wuzh@sibet.ac.cn

Abstract Objective: To explore the application value of automatic cell washing centrifuge in direct antiglobulin test(DAT). **Methods:** A total of 20 blood samples were randomly selected. Washed red blood cells were prepared by traditional manual method(manual group) and automatic cell washing centrifuge(mechanical group). The washing time, interference to DAT detection, supernatant microprotein and red blood cell concentration were compared between the two groups. **Results:** When washing more than 2 specimens at the same time, the time required in the mechanical group was shorter than that in the manual group. The difference was statistically significant($P < 0.05$). Both washing methods could avoid the interference of plasma proteins on the DAT. The microprotein content in the supernatant was lower, and the difference was not statistically significant. However, the concentration of red blood cells in the mechanical group after washing was lower than that in the manual group, and the difference was statistically significant($P < 0.05$). **Conclusion:** The use of automatic cell washing centrifuge to prepare washed erythrocytes could improve the efficiency of experimental operation and reduce biological pollution. The centrifuge may be worthy of promotion in serology laboratories.

Key words automatic cell washing centrifuge; direct antiglobulin test; washing red blood cells

直接抗人球蛋白试验(direct antiglobulin test, DAT)被广泛用于免疫性或药物性溶血性贫血、胎儿新生儿溶血病及输血反应的评估^[1]。在经典的试管法中,用于 DAT 的红细胞需要用生理盐

水洗涤,以去除血浆中过量未结合的 IgG 或补体成分^[2]。红细胞的洗涤通常在血型血清学离心机中手工完成,费时费力且易造成标本外溢污染,而自动细胞洗涤离心机可将洗涤过程封闭在离心机中完成,弥补手工操作的不足。本研究旨在比较手工法和机械法的洗涤效果,评估自动细胞洗涤离心机在血型血清学实验室的应用价值。

1 材料与方法

1.1 材料、仪器与试剂

本站献血者 EDTA 抗凝标本在血型等相关检测完成后,随机选取 20 份剩余血样用于本研究。

*基金项目:苏州市科教兴卫青年科技项目(No: KJXW2020057);苏州市医学重点学科(No:SZXK202118);苏州市姑苏卫生人才计划[No:(2022)143]

¹苏州市中心血站配型室(江苏苏州,215006)

²苏州市中心血站体采科

³中国科学院苏州生物医学工程技术研究所工程化研究中心

通信作者:吴子豪, E-mail: wuzh@sibet.ac.cn

将每份血样平均分成 2 份,分别纳入手工组和机械组。ROTOLAVIT II 自动细胞洗涤离心机(德国 Hettich)、KA-2200 血清学离心机(日本 Kubota)、血型卡离心机(瑞士 DiaMed)、9300 亚甲蓝萃取检测系统(山东沃特世)、PK7300 显像密度仪(美国 Beckman Coulter)、微量总蛋白测定试剂盒(北京瑞尔达,批号 220407)、低离子抗人球蛋白卡(瑞士 Biorad,批号 50531.66.14)、抗-D(IgG)(上海血液生物,批号 20210401)、抗人球蛋白试剂(上海血液生物,批号 20215001)、0.9%生理氯化钠溶液(山东齐都,批号 10C21122403)、AB 型人源血浆(实验室自制)。

1.2 方法

1.2.1 红细胞洗涤 手工组和机械组初始红细胞浓度均为 4 mL 生理盐水加 100 μL 压积红细胞,手工组操作参照《全国临床检验操作规程(第 4 版)》^[3],每次离心后采用吸管移除上清液,机械组离心力(1000×g)和离心时间(1 min)均设定为与手工组的血清学离心机一致,洗涤完成后 2 组均加入生理盐水 2 mL 配置成红细胞悬液。

1.2.2 洗涤时间 从第 1 次离心开始计时直至红细胞悬液配置完成为一次洗涤所需时间。自动细胞洗涤离心机自动显示洗涤时间;手工盐水法记录 3 名操作人员分别同时洗涤 1、2、3、4 个标本的时间,重复 3 次取平均值。

1.2.3 洗涤对 DAT 检测的影响 选取 3 个 RhD 阳性标本,洗涤后进行 DAT 检测,结果均为阴性则取 200 μL 压积红细胞与 200 μL 抗-D 试剂(1 : 16 稀释)在 37℃ 孵育 30 min,洗涤 3 次,随后分别用生理盐水和 AB 型人源血浆配置成 1% 和 3% 的红细胞悬液,进行 DAT 检测。随后将 100 μL DAT 阳性红细胞与 100 μL AB 型人源血浆混合,分别使用手工法和机械法洗涤,进行 DAT 检测。

1.2.4 上清液微量蛋白和红细胞浓度检测 2 组标本洗涤完成后离心取上清检测微量蛋白含量;经过洗涤后的红细胞悬液在显像密度仪中检测浓度。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 19.0 软件对试验结果进行分析。洗涤时间、上清液微量蛋白和红细胞浓度以 $\bar{X} \pm S$ 表示,洗涤时间采用独立样本 *t* 检验,后两者采用配对 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 洗涤时间

机械组每次的洗涤时间固定为 390.000 s,手工组同时洗涤 1、2、3、4 个标本时的洗涤时间分别为(284.667 ± 11.728) s、(350.333 ± 12.526) s、(415.500 ± 16.561) s、(472.333 ± 19.345) s。

手工组同时洗涤 1 个或 2 个标本时所需时间

短于机械组,差异有统计学意义($P < 0.05$);当同时洗涤 3 个或 4 个标本时机械组所需时间较短,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 洗涤对 DAT 检测的影响

RhD 阳性红细胞在与抗-D 试剂孵育后致敏,当用生理盐水和 AB 型人源血浆分别配成 1% 的红细胞悬液时,抗人球卡显示生理盐水组均为 3+,AB 型人源血浆组均为 1+(图 1a);当用多抗试剂检测 3% 的红细胞悬液时,生理盐水组均为 ±,AB 型人源血浆组均为 0。手工法和机械法洗涤加入 AB 型人源血浆的致敏红细胞后,抗人球卡均显示 3+(图 1b)。



a:致敏红细胞分别与生理盐水和 AB 型人源血浆混合后的 DAT 结果;b:致敏红细胞与 AB 型人源血浆混合后经手工法和机械法洗涤的 DAT 结果。

图 1 洗涤对 DAT 检测的影响

2.3 上清液微量蛋白和红细胞浓度

2 种方法洗涤后上清液微量蛋白含量差异无统计学意义,但机械组红细胞浓度显著低于手工组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

表 1 2 种方法洗涤后上清液微量蛋白和红细胞浓度比较

		$\bar{X} \pm S$	
组别	例数	上清液微量蛋白含量/(g · L ⁻¹)	红细胞浓度/%
手工组	20	0.011 ± 0.004	0.593 ± 0.084
机械组	20	0.008 ± 0.004	0.231 ± 0.062
<i>t</i>		1.892	20.327

3 讨论

试验前洗涤红细胞可减少血浆中过量的 IgG 或补体对 DAT 结果的抑制作用^[4]。目前实验室常用的手工洗涤法操作耗时,且在洗涤过程中因多次移液、混合和离心不可避免地造成液滴飞溅,导致生物污染。自动细胞洗涤离心机可在离心机中自动完成洗涤的全过程,且最多可同时洗涤 24 个标本。本研究旨在通过比较 2 种方法的洗涤效果,评估自动细胞洗涤离心机在血清学实验室的应用价值。

本实验室为江苏省首家引进该自动细胞洗涤离心机的血清学实验室。从洗涤过程所需时间看,洗涤 1 个或 2 个标本时机械组不具备优势,但自动细胞洗涤离心机的使用在一定程度上减少了手工操作,缓解了工作人员的操作压力。当同时洗涤的标本数超过 2 个时,机械组高效的的优势得以体现。随着医院输血科抗体筛查工作的广泛开展^[5],本实验室在同一时间接收到 2 个以上标本的情况也显著增多。工作人员可在自动细胞洗涤离心机对多个标本前处理的同时,完成盐水法抗体鉴定。因此,机械组除了缩短洗涤时间,也使单个标本的检测时间缩短了至少 10 min,这对需要紧急用血的患者有重要意义。

经典试管法检测 DAT 要求对红细胞进行洗涤操作,研究结果显示血浆存在的情况下有可能造成 DAT 结果假阴性。吴伟鑫等^[6]通过探讨洗涤因素对抗人球蛋白卡检测 DAT 的影响,指出使用抗人球蛋白卡检测 DAT 前也有必要对红细胞进行 3 次洗涤,与本研究中未洗涤红细胞可造成卡式法 DAT 减弱的结果一致。同时,本研究结果表明手工法和机械法洗涤红细胞均能有效避免血浆成分对 DAT 结果的干扰。

为进一步验证 2 种方法的洗涤效果,此次研究检测了洗涤后的上清液微量蛋白含量和红细胞浓度,结果表明洗涤后 2 组的上清液微量蛋白均很低,与上文洗涤能够避免干扰 DAT 检测结果相同。

然而,机械组洗涤后的红细胞浓度明显低于手工组,推测是由于自动细胞洗涤离心机在洗涤后移除上清液时采用倾倒的方式,从而丢失较多红细胞。本实验室在多次研究后发现,当洗涤完成后加入约 0.6 mL 生理盐水重悬,即可得到浓度约 3% 的红细胞悬液,基本足够完成一次血型血清学检测。

此外,由于自动细胞洗涤离心机在洗涤时同时为 24 个标本孔注水,而通常参比实验室在同一时间段内无法达到该标本量,因此不可避免地造成洗液浪费。再者,由于洗涤过程中对红细胞的损耗较大,该自动细胞洗涤离心机无法用于压积红细胞的制备。因此,该仪器后续可在注水口数量的可调节性、移除上清液由倾倒式改为感应吸取式等方面加以改进。

综上所述,应用自动细胞洗涤离心机制备洗涤红细胞,可提高实验操作效率、减少生物污染,值得在血清学实验室中推广。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 段秉政,连俊慧,王淑莲,等.直接抗人球蛋白试验抗体凝集强度的影响因素与临床意义[J].临床血液学杂志,2021,34(8):548-551.
- [2] Bicakci Z. False-positive direct antiglobulin test in hematologic malignancies[J]. *Pediatr Hematol Oncol*, 2017,34(1):36-37.
- [3] 尚红,王毓三,申子瑜.全国临床检验操作规程[M].4版.北京:人民卫生出版社,2014:127-128.
- [4] Parker V, Tormey CA. The Direct Antiglobulin Test: Indications, Interpretation, and Pitfalls [J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2017,141(2):305-310.
- [5] 董珀,许飞,曹锁春,等.微孔板木瓜酶法筛查不规则抗体技术关键参数的确定[J].临床血液学杂志,2021,34(12):874-877.
- [6] 吴伟鑫,魏俊杰,张云聪,等.红细胞洗涤对微柱凝胶卡检测直接抗人球蛋白试验影响的分析[J].临床输血与检验,2020,22(3):272-276.

(收稿日期:2022-06-09 修回日期:2022-08-16)

(上接第 880 页)

- [10] Du L, Ma X, Shen X, et al. Neonatal hyperbilirubinemia management: Clinical assessment of bilirubin production[J]. *Semin Perinatol*, 2021,45(1):151351.
- [11] 王尚,刘源,郑璐,等.总胆红素、纤维蛋白原/白蛋白比值及二者联合检测预测 PCI 术后支架内再狭窄的价值[J].临床心血管病杂志,2021,37(8):714-719.
- [12] 张鹏,张瑞妮,李飞,等.行急诊经皮冠状动脉介入治疗的急性 ST 段抬高心肌梗死患者新发房颤的预测因素[J].山西医科大学学报,2018,49(2):136-

139.

- [13] 胡昌灿,于海初,孙桂霞,等.血小板/淋巴细胞比值联合 Grace 评分对非 ST 段抬高型急性冠状动脉综合征院内心血管事件的预测价值[J].中国动脉硬化杂志,2019,27(8):700-707.
 - [14] Muniyappa P, Kelley D. Hyperbilirubinemia in pediatrics: Evaluation and care[J]. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care*, 2020,50(8):100842.
- (收稿日期:2022-05-17 修回日期:2022-06-30)