

红细胞渗透脆性试验方法改良的探讨*

张玲, 胡朝晖, 潘建华, 吴鹏, 周锐雄, 朱庆义

(广州金域医学检验中心血液病理中心实验室, 广州 510330)

摘要:目的 改良红细胞孵育渗透脆性试验(Osmotic fragility test, OFT)验证改良方法与标准操作方法结果一致性。方法 对OFT采取加样取量及检测试剂减半和采用不同检测设备进行比色评价改良方法检测效果,即选取脆性增大和脆性降低样本100例(阳性50例,阴性50例),用一种加样改良和测试改良方法与传统方法进行结果比对。结果 100例OFT样本采取加样量与试剂减半检测出的结果与厂家标准操作加样量所测结果验证一致($T=1.6608$, $P>0.05$),两组数据间对比差别无统计学意义。结论 OFT改良方法替代传统OFT初筛方法可以更快、更客观地出结果服务于临床,且能有效地降低试剂和人力成本,提高检测效率。因此,该法可作为批量计生体检单位及检测设备缺乏的基层医院筛查珠蛋白生成障碍性贫血方法首选条件。

关键词:红细胞孵育渗透脆性试验;改良方法;检测设备;试剂成本;提高效率

中图分类号:R446.11 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2015)03-094-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2015.03.027

Discussion of Improved Examination Method of Osmotic Fragility Test

ZHANG Ling, HU Zhao-hui, PAN Jian-hua, WU Peng, ZHOU Rui-xiong, ZHU Qing-yi

(Guangzhou Kingmed Center for Clinical Laboratory, Guangzhou 510330, China)

Abstract: **Objective** To verify result consistency of the improved examination method and the standard operation method with the erythrocyte osmotic fragility test (OFT). **Methods** The samples and reagents were reduced half volume and used different testing equipment to evaluate methods for OFT. Selected 100 samples that the brittleness were increased and decreased (50 samples positive and negative respectively), used a kind of improved examination method and traditional test method to evaluate the consistency. **Results** The detection result of improved examination method and the detection results of the manufacturer standard method were consistent ($t=1.6608$, $P>0.05$). So, there was no significant difference of contrast between two groups of data. **Conclusion** Improved method OFT alternatives to traditional OFT screening method could be faster, more objectively the results of clinical service, and could effectively reduce reagent and manpower cost, improve the efficiency of work. Therefore, this method could be used to groups detection and lack of equipment for the primary care of hospital screening thalassemia disease method is preferred.

Keyword: osmotic fragility test/(OFT); improved method; equipment; reagent cost; efficiency

红细胞渗透脆性试验^[1](一管法)是目前能筛查多种贫血,包括珠蛋白生成障碍性贫血在内的一种有效方法。已经在相当的范围内得到了推广,在国内外有广泛报道^[2~5]。适用于体外检测贫血等引起的红细胞渗透脆性病变,特别是红细胞渗透脆性降低一类的贫血症筛查(如珠蛋白生成障碍性贫血、严重缺铁性贫血症)。此法主要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、遗传性椭圆形细胞增多症^[6]、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等溶血病的筛查^[7~13]。其检验原理是根据正常红细胞在渗透压逐渐减低的盐溶液中表现有一定的抵抗低渗盐溶液的能力^[14],目前多使用传统肉眼观察红细胞溶血率或使用721分光光度计比色方法进行测定,操作较为繁杂,结果也不客观,检测人员眼睛易疲劳或手工操作比色强度过高而致操作失误发给临床本可避免的错误

结果。所以,针对以上问题,本文提供一种快速简便、结果可靠、试剂用量较少的改良检测方法。

1 材料和方法

1.1 对象 实验组随机选取当天检测红细胞渗透脆性试验样本200例,对照组选取当天送检的体检中心健康人群样本100例(排除溶血性及其他贫血性疾病)EDTA-K₂抗凝血2.0 ml分别进行两种不同设备和两种不同加样量的方法作对比验证统计分析。

1.2 仪器和方法

1.2.1 红细胞渗透脆性试验:RT-9600半自动生化仪、TECAN SUNRISE酶标仪,37℃恒温水浴箱,试剂由广州米基公司提供A、B、C三种母液组成。

1.2.2 血红蛋白分析:美国Helena全自动快速电泳系统(SPIFE 3000)配套试剂电泳法。

1.2.3 血常规分析:贝克曼COULTER(LH-750)

* 作者简介:张玲(1975—),女,硕士,主管技师,主要研究方向血液学疾病, Tel:13660331731。

全自动血细胞分析仪配套试剂仪器法。

1.2.4 THa1 基因检测: α -THa1 基因用 GAP-PCR 法检测,试剂由亚能公司提供, β -THa1 基因用反向点杂交(RDB)法检测,试剂由深圳益生堂生物公司提供。

1.3 判断标准

1.3.1 OFT 根据厂家说明书参考范围(经过本科室验证):成人参考值范围为:溶血 65%~100% (阴性),55%~65%为临界范围;新生儿、脐血参考值范围为:溶血 55%~100% (阴性),45%~55%为临界范围。

1.3.2 根据《血液病诊断及疗效标准》^[7]电泳法结果诊断 α -珠蛋白生成障碍性贫血时 HbA2 临界值为 $\leq 2.6\%$,诊断 β -珠蛋白生成障碍性贫血时 HbA2 临界值为 $\geq 3.8\%$,以基因检测为金标准。

1.4 统计学分析 成组设计资料 t 检验。

2 结果

2.1 200 例实验组与 100 例对照组红细胞渗透脆性试验 分别用不同设备及不同加样方式同时检测,筛查出 24 例脆性降低患者两种方法结果一致,正常患者和对照组结果一致。各组间比值结果无显著性差异($t=1.6608$, $P>0.05$),见表 1、表 2。

表 1 两种不同加样量同一检测仪器部分结果比对

内容	加样量		阳性标本溶血率(%)			阴性标本溶血率(%)		
	样本(μ l)	试剂(ml)	n	\bar{x}	s	n	\bar{x}	s
改良前	10	2.50	24	51	15.55	176	100	5.52
改良后	5	1.25	24	45	13.77	176	95	3.5

2.2 24 例脆性降低患者再用琼脂糖凝胶碱性电泳(pH8.6)验证结果 见表 3。

2.3 24 例脆性降低患者经 HB 电泳证实后再用基因方法确证结果 见表 4。

3 讨论

3.1 红细胞渗透脆性试验(OFT)传统的测定方法采用目测观察其溶血情况,此法仅能观察到溶血的大致情况,不能量化红细胞破裂的程度。采用 721 分光光度法和 RT-9600 半自动生化仪选 530nm 波长虽然能精确测定其量,但试剂耗用量按照厂家说明书(米基)要求总共为 2.5 ml,利用半自动生化仪比色需在此基础上增加一倍试剂耗用量,即 5.0 mmol/L,且试剂 A 液吸入仪器检测后不能回流到原管,A 液再与 C 液混匀时,对整体浓度稀释有所降低,每次测试过程繁琐,且仪器吸样量较大,所以,此法耗时耗试剂,也不易于批量样本测试。本文改良方法采用酶标仪选取双波长(测定波长 450 nm,参比波长 620 nm),改用微量

加样器加样,利用微孔酶标板上机比色试剂使用量少的优点,将半自动生化仪比色改为酶标仪上机比

表 2 两种不同测试方法同一加样方式结果比对

改良前 RT-9600 生化仪 测试			改良后 TECAN 酶标仪 测试		
生 A1 值	生 A2 值	溶血率(%)	酶 A1 值	酶 A2 值	溶血率(%)
0.231	0.311	59	0.199	0.27	59
0.353	0.468	60	0.337	0.447	60
0.146	0.398	29	0.131	0.333	31
0.215	0.309	56	0.2	0.273	59
0.428	0.449	76	0.298	0.299	80
0.184	0.322	46	0.151	0.268	45
0.196	0.284	55	0.144	0.203	57
0.322	0.388	66	0.265	0.314	68
0.54	0.626	69	0.42	0.442	76
0.202	0.293	55	0.177	0.244	58
0.392	0.338	92	0.334	0.283	94
0.53	0.438	96	0.421	0.354	95
0.434	0.355	98	0.334	0.275	97
0.343	0.285	96	0.291	0.241	97
0.39	0.329	95	0.283	0.231	98
0.363	0.305	95	0.3	0.246	97
0.632	0.541	93	0.473	0.394	96
0.453	0.38	95	0.406	0.349	93
0.442	0.37	96	0.391	0.321	97
0.489	0.42	93	0.408	0.341	96
.....

说明:1. 数据样本比对为部分结果;2. 本项目留样复查标本结果可接受标准 ALE 为 $\pm 20\%$ (本室自建);3. 检验结果解释:正常溶血率:指红细胞渗透脆性在正常范围。溶血率降低:指红细胞渗透脆性降低;常见于珠蛋白生成障碍性贫血或低频基因携带者、严重缺铁性贫血者,小型红细胞增多症贫血者等。溶血率轻度降低:指红细胞溶血率不明显减低,在正常与可疑贫血症之间。

表 3 24 例红细胞溶血率降低患者 pH8.6 琼脂糖凝胶电泳验证结果

项目	疑 α 珠蛋白生成障碍性贫血	疑 β 珠蛋白生成障碍性贫血	疑 HbH 病	疑正常
验证结果(n)	5	13	4	2
符合率(%)	100%	100%	100%	0

说明:电泳法结果诊断 α -珠蛋白生成障碍性贫血时 HbA2 临界值为 $\leq 2.6\%$,诊断 β -珠蛋白生成障碍性贫血时 HbA2 临界值为 $\geq 3.8\%$ 。

表 4 24 例红细胞溶血率降低患者基因确诊结果

α -Thal 基因类型	n	比例(%)	β -Thal 基因类型	n	比例(%)
-/aa	5	20.84	CD41-42	8	33.34
-a3.7/aa	1	4.17	CD654	2	8.34
-a4.2/aa	1	4.17	CD17	1	4.17
-SEA/-a3.7	3	12.5	CD-28	1	4.17
-SEA/-a4.2	1	4.17	CD71-72	1	4.17

色,改变米基 OFT(一管法)说明书要求样本加样量 10 μ l 减至 5 μ l,同时试剂量也随样本量呈正比例下调一半,即由 2.5 ml 减至 1.25 ml,可见,改用微量加样器加样,不但可以更好地消除浓度误差对实验结果的影响,而且还提高了检测效率(改良前方法测试 200 个样本耗时 2 h,改良后完成只需 10 min),克服了传统两种方法的缺陷,而且测试过程简单、快速、结果客观,另外仪器不需吸样,采用微孔板加微量上机检测即可,此法有效地节约了试剂成本,提高了检测效率。综上所述,目前所使用的传统方法,对试剂增加成本投入,且操作较为繁杂,手工操作环节较多,容易出现操作失误。从本文表中结果可以看出,本研究改良红细胞渗透脆性试验加样量和测试方式比对验证结果两种检测方法的结果无显著性差异($P>0.05$)。通过其溶血率变化来看,可以证明酶标微孔板上酶标仪检测用于临床初筛珠蛋白生成障碍性贫血是一种结果客观、检测快速、节约试剂成本有效的评价方法。

3.2 值得一提的是本文中有 2 例红细胞渗透脆性试验结果降低的样本用电泳方法未筛查出,经基因确诊为 $-a^{3.7}/aa$ 和 $-a^{4.2}/aa$,可见,对于静止型珠蛋白生成障碍性贫血用单一的传统筛查方法是较容易漏掉的,所以,为更好地提高珠蛋白生成障碍性贫血筛查率,应该尽量联合血液学分析、OFT 溶血率、pH8.6 琼脂糖凝胶电泳、Heinz 小体镜检结果综合分析为临床提供更可靠的诊疗信息。

3.3 不同因素对红细胞渗透脆性试验结果有一定影响,应注意以下几点:①每次加检体温育数不易太多,20~25 例较佳;②检体必须直接注入试剂中,不可沿着管壁;③严格控制水浴温度在 37℃ 恒温水浴条件下测定,温育时间也须严格控制,否则容易导致红细胞脆性增大^[15];④检测 ROFT 前切勿饮酒,因乙醇分解后产生的乙醛浓度不断增加对红细胞膜的固化修饰所致^[16];⑤注射高尝试葡萄糖对 ROFT 也有影响,可使渗透脆性增加和膜脂质过氧化损伤^[17]。

参考文献:

- [1] 叶应妩,王毓三,申子瑜.全国临床检验操作规程[S].3版,南京:东南大学出版社,2006:168-169.
- [2] 杜传书,曾瑞萍,华小云,等.珠蛋白生成障碍性贫血一管筛查法[M].一种简易筛查人群珠蛋白生成障碍性贫血的方法,1983.
- [3] Sirichotivakul. Erythrocyte osmotic fragility test for screening of alpha-thalassemia-1 and beta-thalassemia trait in pregnancy[J]. Int Gynaecol & Obst, 2004.
- [4] Panyasei. A simplified screening for alpha-thalassemia 1 (SEA type) using a combination of a modified osmotic fragility test and a direct PCR on whole blood lysates[J]. Acta Haematol, 2002(108):74-78.
- [5] Sirichotivakul. A comparison of the accuracy of the corpuscular fragility and mean corpuscular volume tests for the alpha-thalassemia 1 and beta-thalassemia trait[J]. Int J Gynecol Obstet, 2009(in printing).
- [6] 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.
Zhang BH, Chen C, Cen DY, et al. Twenty-six children hereditary spherocytosis[J]. J Appl Clin Pediatr, 2008, 23(15):1162-1164.
- [7] 贾冰,林志芳,纪新梅,等.常用筛查方法在珠蛋白生成障碍性贫血诊断中的临床应用[J].检验医学与临床,2010,7(13):1339-1340.
Jia B, Lin ZF, Ji XM, et al. Clinical application of commonly used screening methods for diagnosis of thalassemia[J]. Lab Med Clin, 2010, 7(13):1339-1340.
- [8] 陈冬,李萍,荣卡彬,等.珠蛋白生成障碍性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.
Chen D, Li P, Rong KB, et al. The application research of operative technology in detecting thalassemia[J]. Chinese Journal of Birth Health and Heredity, 2008, 16(6):39-41.
- [9] 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珠蛋白生成障碍性贫血诊断中的价值[J].中华检验医学杂志,2005,28(3):244-246.
He YJ, Yang XH, Ma FG, et al. The value of the combined tests of mean corpuscular volume, red cell osmotic fragility test and hemoglobin electrophoresis for diagnosis of thalassemia[J]. Chin J Lab Med, 2005, 28(3):244-246.
- [10] 吴学礼,周玉球,肖鸽飞,等.三种红细胞渗透脆性试验用于珠蛋白生成障碍性贫血筛查的临床应用评价[J].海南医学,2004,15(4):15-17.
Wu XL, Zhou YQ, Xiao GF, et al. Evaluation of three red cell osmotic fragility tests in screening for thalassemias[J]. Hainan Medicine, 2004, 15(4):15-17.
- [11] 孙耀君,李汉金,王秀云,等.MCV 和红细胞脆性试验在珠蛋白生成障碍性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.
Sun YJ, Li HJ, Wang XY, et al. The MCV and RBC brittleness test in the mediterranean anemia screening diagnosis value[J]. Chinese Healthy Birth and Genetic Magazine, 2007, 15(8):115-116.
- [12] 李长钢,石红松,王纓,等.MCV 及红细胞渗透脆性试验在诊断珠蛋白生成障碍性贫血的临床价值[J].中华现代儿科学杂志,2004,1(3):210-212.
Li CG, Shi HS, Wang Y, et al. MCV and RBC fragility test in diagnosis of mediterranean anemia[J]. Journal of Chinese Modern Pediatrics, 2004, 1(3):210-212.
- [13] 陈加力,区丽群.珠蛋白生成障碍性贫血患者血液 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.

- Chen JL, Ou LQ. The Mediterranean anemia patients blood MCV, MCH, RDM and RBC brittleness test [J]. J Mod Lab Med, 2004, 19(4): 32-33.
- [14] 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.
- Tan QX. Clinical Hematology and Blood Testing [J]. 3th Ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2005: 112.
- [15] 潘干华, 李哲刚, 申莞子, 等. 不同抗凝剂和温度对红细胞渗透脆性试验结果的影响[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(4): 433-434.
- Pan GH, Li ZG, Shen YZ, et al. Influences on erythrocyte osmotic fragility tests result with different anticoagulants and temperatures[J]. Int J Lab Med, 2011, 32(4): 433-434.
- [16] 郭希超, 陈晓刚, 陈瑜, 等. 急性酒精中毒后红细胞膜脆性检查[J]. 临床检验杂志, 2001, 19(3): 186.
- Guo XC, Chen XG, Chen Y, et al. Acute alcohol poisoning after the red cell membrane brittleness [J]. Chinese Journal of Clinical Laboratory, 2001, 19(3): 186.
- [17] 权国波, 韩颖, 杨超, 等. 海藻糖抑制高浓度葡萄糖诱导的红细胞磷脂酰丝氨酸暴露、渗透脆性增高和膜脂质过氧化损伤的研究[J]. 中国实验血液学杂志, 2008, 16(6): 1442-1446.
- Quan GB, Han Y, Yang C, et al. Inhibitory effect of trehalose on phosphatidylserine exposure, osmotic fragility and membrane lipid peroxidation damage of erythrocytes induced by high concentration of glucose [J]. Exp Hematol, 2008, 16(6): 1442-1446.

收稿日期: 2015-01-17

修回日期: 2015-01-25