

• 检验技术与方法 •

两种方法测定孕妇 IgG 型抗-A(B)效价的比较*

杨树法, 李洋远, 翟燕红, 王文娟, 赵 娟

(首都医科大学附属北京妇产医院北京妇幼保健院, 北京 100026)

摘要:目的 对微柱凝胶技术和流式细胞术两种检测 IgG 型抗 ABO 抗体的方法进行比较。方法 以 O 型孕妇为实验组, A/B 型孕妇作为对照组, 分别用微柱凝胶技术和流式细胞术检测 IgG 型抗 ABO 抗体, 分析实验组和对照间阳性率的差别以及两种方法间相关性。选取不同滴度样品在不同日期进行检测以比较两种方法的重复性。结果 共收集实验组 300 例, 对照组 300 例。微柱凝胶技术和流式细胞的检测结果表明, 实验组阳性率高于对照组, 差异有统计学意义($P<0.05$)。微柱凝胶检测和流式细胞术检测相关系数 $r_s=0.694$ 。微柱凝胶技术检测的变异系数小于流式细胞检测变异系数($P<0.05$)。结论 ABO 血型不合多见于 O 型孕妇, 流式细胞检测与微柱凝胶技术具有很好的相关性, 流式细胞术重复性好于微柱凝胶技术。

关键词: ABO 血型抗体; 流式细胞术; 微柱凝胶技术

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.14.042

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)14-1916-03

Comparison of two methods for testing anti-ABO IgG antibody titer in pregnant women*

Yang Shufa, Li Yangyuan, Zhai Yanhong, Wang Wenjuan, Zhao Juan

(Beijing Maternal and Child Health Care Service Center, Affiliated Beijing Obstetrics and Gynecology Hospital, Capital Medical University, Beijing 100026, China)

Abstract: Objective To compare the 2 methods of the flow cytometry and the microcolumn gel agglutination assay for testing anti-ABO Ig G antibody. **Methods** The flow cytometry and the microcolumn gel agglutination assay were adopted to detect the anti-ABO IgG antibody in the O blood type pregnant women(experimental group) and the A/B blood type pregnant women (control group). The difference in the positive rates between the experimental and control groups and the correlation between these two methods were analysed. The different titers of samples were selected for detection on different days to compare their reproducibility. **Results** 300 samples from the experimental group and 300 samples from the control group were collected. The detection results of 2 methods showed that the positive rates of the experimental group was significantly higher than that of the control group with statistical difference($P<0.05$). The correlation coefficients(r_s) between these two methods were 0.694. The coefficient of variation in the flow cytometry was smaller than that in the microcolumn gel agglutination assay($P<0.05$). **Conclusion** ABO blood type incompatibility is more common in O type pregnant women. The flow cytometry and the microcolumn gel agglutination assay possess good correlation. The reproducibility of the flow cytometry is better than that of microcolumn gel agglutination assay.

Key words: ABO antibody; flow cytometry; microcolumn gel test

IgG 型 ABO 血型抗体在孕期母子血型不合的情况下可以通过胎盘进入胎儿体内, 导致流产、新生儿溶血等不良妊娠结局, 测定孕妇血液中 IgG 型 ABO 血型抗体可以对此类结局进行预测。抗人球蛋白实验(又称为 Coombs 实验)是检测血清中 IgG 型抗 ABO 抗体的主要方法, 检测过程手工操作多, 易受到 IgM 型抗体的影响, 结果依赖肉眼判断, 导致实验结果准确性不高, 不同实验室的检测滴度能相差 4 个滴度^[1-2], 容易对病情造成误判。流式细胞仪^[3-4]作为新兴方法, 受主观因素影响小, 不受 IgM 型抗体影响, 在检测 IgG 型抗 ABO 抗体方面具有明显的优势, 因此本研究以孕妇为研究对象, 建立了流式细胞术检测 IgG 型抗 ABO 抗体的方法, 并与微柱凝胶技术的检测结果进行了比较。

1 资料与方法

1.1 一般资料 以 2011 年 6 月至 2013 年 4 月间来本院就诊的产科患者为研究对象。实验组为 O 型孕妇, 同时采集孕妇

和丈夫血液样品, 孕妇为不抗凝血液, 丈夫血液为肝素抗凝标本。对照组为 A/B 型的孕妇, 只采集孕妇标本。

1.2 检测方法 所有实验组和对照组标本均用微柱凝胶技术和流式细胞术进行检测。

1.2.1 微柱凝胶技术检测 EDTA 抗凝的静脉血, 经过正反血型鉴定后, 然后用 0.9% 生理盐水洗涤 3 次, 制成 1% 的红细胞悬液。取 200 μ L 孕妇血清与 200 μ L 0.2 mol/L β -巯基乙醇(华美生物工程公司)混合后, 37 $^{\circ}$ C 水浴孵育 30 min 进行血清灭活, 然后向 DianaCoombs 卡(GRIFOLS)微孔中加入 50 μ L 1% 的红细胞悬液(实验组加入红细胞与丈夫血型一致, 对照组向 A 型血清中加入 B 型红细胞, B 型血清中加入 A 型红细胞)以及 25 μ L 灭活血浆, 置卡在 37 $^{\circ}$ C 孵育器内孵育 15 min 后, 1 100 r/min 离心 9 min。对于阳性结果(2+ 以上), 将灭活的血清进行倍比稀释后, 按照出现 2+ 判读滴度结果。

1.2.2 流式细胞仪测定 参照 Pins 等^[5]的方法进行, 生理盐

* 基金项目: 首都医科大学附属北京妇产医院科研基金资助项目(201102)。 作者简介: 杨树法, 男, 主管检验师, 主要从事孕产妇以及新生儿疾病的实验室诊断研究。

水洗后的红细胞(HCT 为 80%左右)混悬液用 Karnovskys 固定液(0.04%福尔马林,0.000 5%CaCl₂,0.05%戊二醛,0.002% 0.1 mol/L 二甲酸钠缓冲液,pH=7.4)进行 40 倍稀释后,固定 20 min。然后依次用含 6%牛血清清蛋白(Sigma-Aldrich)的 PBS 洗一次,含 0.6%牛血清清蛋白的 PBS 洗 3 次,最后制成红细胞浓度为 1%的生理盐水混悬液。该混悬液在 4℃条件下保存,可使用 6 周。35 μL 未稀释的血清与 25 μL 1%的固定红细胞(实验组加入红细胞与丈夫血型一致,对照组向 A 型血清中加入 B 型红细胞,B 型血清中加入 A 型红细胞)4℃孵育 30 min,然后用 3 mL FACS 缓冲液(0.1% BSA-Hanks 缓冲盐溶液)洗涤 3 次。然后加入 1:800 稀释的 FITC 标记的兔抗人 IgG 抗体(Sigma-Aldrich)100 μL,4℃避光孵育 1 h。然后在流式细胞仪上(Beckman Coulter,Epics XL)进行检测。根据前向角散射(FSC)与侧向角散射(SSC),设定“门”使红细胞与血小板、细胞碎片区别开来。收集 10 000 个细胞,进行流式细胞分析。以 AB 型血清为阴性对照血清。样品浓度计算以平均荧光强度比值(MFIR)表示血清中抗 A/B IgG 型抗体的浓度,其计算方法为用样品的荧光强度几何均值除以阴性对照的荧光强度几何均值,其比值即为 MFIR。

1.2.3 两种方法重复性比较 取 5 份标本,滴度分别为 1:32、1:128、1:256、1:512 和 1:1 024。连续 10 d 同时进行

流式细胞仪和微柱凝胶技术检测,计算其均值和标准差以及变异系数(CV 值),用 CV 值评价两种方法重复性。

1.3 统计学处理 实验组所得数据输入 SPSS15.0 进行统计分析,实验组和对照组间检测结果的比较用 χ^2 检验,微柱凝胶技术和流式细胞检测结果间的相关性分析用 Spearman 等级相关,两种方法重复性比较用配对 t 检验。

2 结 果

2.1 研究对象一般情况 实验组共收集 O 型血孕妇 300 份样品,其丈夫血型 A 型 107 份,B 型 142 份,AB 型 49 份,孕妇年龄为(31.82±4.26)岁。对照组收集 A 型血样 150 份样品,B 型血样 150 份样品,孕妇年龄为(32.82±4.66)岁。

2.2 微柱凝胶技术检测结果 微柱凝胶技术结果见表 1,一般认为大于 1:64 具有临床意义,因此将滴度小于 1:32 的病例作为阴性进行 χ^2 检验。滴度大于 1:64 时,实验组阳性数高于对照组。

2.3 流式细胞检测结果 流式细胞仪检测结果见表 2。经 χ^2 检验实验组和对照组不同 MFIR 值组的发生数差异具有统计学意义($\chi^2=61.62,P<0.05$)。将 MFIR 值小于 3 作为阴性进行 χ^2 检验,MFIR 值大于 3 的组别,实验组的数量均大于对照组($P<0.01$)。

表 1 IgG 型抗 ABO 抗体凝集实验检测结果

组别	<i>n</i>	<1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	>1:1 024
实验组[<i>n</i> (%)]	300	210(70.00)	29(9.67)*	28(9.33)*	15(5.00)*	9(3.00)*	9(3.00)*
对照组[<i>n</i> (%)]	300	267(89.00)	14(4.67)	10(3.33)	6(2.00)	1(0.33)	2(0.67)

*: $P<0.01$,与对照组比较。

表 2 IgG 型抗 ABO 抗体流式细胞仪检测结果[*n*(%)]

组别	<i>n</i>	<3	3~5	5~10	10~20	20~40	40~80	80~160	>160
实验组	300	126(42.00)	52(17.33)	37(12.33)*	22(7.33)*	25(8.33)*	19(6.33)*	15(5.00)*	4(1.33)*
对照组	300	219(73.00)	28(9.33)	16(5.33)	13(4.33)	13(4.33)	6(2.00)	4(1.33)	1(0.33)

*: $P<0.01$,与对照组比较。

2.4 微柱凝胶技术与流式细胞检测结果的相关性分析 对流式细胞的 MFIR 值取 log 值与凝集实验的滴度进行等级相关分析,结果如图 1。Spearman 相关系数 $r_s=0.694,P<0.05$ 。

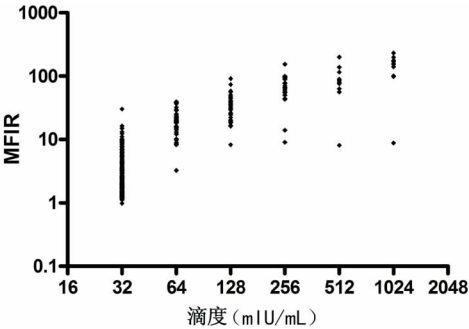


图 1 微柱凝胶技术与流式细胞实验相关性分析

2.5 两种方法重复性比较 两种方法重复性比较的结果如表 3,流式细胞检测的 CV 值小于微柱凝胶技术检测, $t=20.064$,

$P<0.05$ 。

表 3 两种方法重复性比较

样品	微柱凝胶技术		流式细胞检测	
编号	滴度($\bar{x}\pm s$,mIU/mL)	CV 值(%)	MFIR($\bar{x}\pm s$)	CV 值(%)
1	41.60±20.24	48.65	4.27±0.52	12.29
2	153.60±75.12	48.91	21.51±1.32	6.13
3	307.20±150.24	48.91	60.84±2.34	3.84
4	614.40±300.49	48.91	80.17±3.08	3.85
5	563.46±563.46	52.40	158.41±5.71	3.61

3 讨 论

抗人球蛋白实验中,微柱凝胶技术相对于试管法手工操作少,重复性好并且敏感性高,不同实验室对相同标本检测结果的差值要小于试管法^[1,6],被越来越多的血库和移植中心所采用^[7]。研究中用微柱凝胶技术对 O 型孕妇组成的实验组和 A/B 型孕妇组成的对照组进行了 IgG 型抗 ABO 抗体的检测,一般认为滴度大于 1:64 具有临床意义^[8],容易产生新生儿溶

血,因此,将滴度小于 1 : 32 作为阴性,进行 χ^2 检验,结果表明,实验组的阳性率与国内孕妇检测的结果基本一致^[9],实验组的阳性率要高于对照组。许多研究认为,新生儿溶血容易发生在 O 型血孕妇,在研究中表现为实验组阳性检出率高。

由于流式细胞技术检测 IgG 型抗 ABO 抗体没有参考值范围,在对结果进行分析时,我们先对实验组和对照组的构成进行了统计分析,两组的检测值构成差异具有统计学意义($P<0.05$)。然后,我们参照 Stussi 等^[10]的研究将 MFIR <3 作为阴性结果,对不同检测值组别进行了分析,实验数据表明 MFIR >3 以上时,实验组的阳性数要明显高于对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。需要指明的是将 MFIR <3 定为参考范围,缺少临床数据支持,在流式细胞术应用于临床时,需要建立合适的参考值范围。

将流式细胞术和微柱凝胶技术的检测结果进行 Spearman 相关分析,两者相关系数 $r_s=0.694$, $P<0.05$,流式细胞术和微柱凝胶技术检测间存在很好的相关性。通过图 1 发现,一些样品微柱凝胶技术检测表现为高滴度,而流式细胞检测值并不高,其原因可能是受 IgM 型抗体的影响,未灭活的 IgM 抗体会导致红细胞凝集,使结果出现假阳性或检测的滴度升高^[11-12]。而流式细胞的检测不受标本中 IgM 型抗体的影响,因此 IgM 型抗体导致的微柱凝胶检测结果阳性的标本在流式细胞检测为阴性。在 β -巯基乙醇对 IgM 型抗体灭活不充分时,该情况将更加明显。因此,在用微柱凝胶技术进行检测时,血清灭活是影响实验准确与否的重要步骤。

在两种方法进行重复性评价的实验中,所用的试剂为同一批次试剂,微柱凝胶检测不同日期间滴度可以相差 2 个滴度,这也佐证了 Coombs 实验结果准确性不高,不同实验室的检测滴度能相差 4 个滴度^[1-2],容易对病情造成误判。在对两种方法的 CV 值进行统计分析时,研究中采用了两种方法:一种是用原始值求均值和标准差然后计算 CV 值的方法,结果见表 3;另一种是对检测结果取 Log 值后求均值和标准差然后计算 CV 值的方法,结果未给出。两种统计方法得出的结论一致,微柱凝胶技术检测的结果的 CV 值显著高于流式细胞检测,表明流式细胞的重复性要高于微柱凝胶检测。

综上所述,IgG 型抗体在 O 型血孕妇检出率高于非 O 型血孕妇,流式细胞的检测结果与微柱凝胶技术检测结果具有很好的相关性,流式细胞术的重复性要高于微柱凝胶技术。

参考文献

[1] Kumlien G,Wilpert J,Safwenberg J,et al. Comparing the tube and gel techniques for ABO antibody titration,as performed in three European centers[J]. Transplantation,2007,84(12 Suppl):S17-19.

[2] Tanabe K. Interinstitutional variation in the measurement of anti-A/B antibodies;the Japanese ABO-Incompatible Transplantation Committee survey[J]. Transplantation,2007,84(12 Suppl):S13-16.

[3] 徐树良,田爱民,陈军浩,等. 流式细胞术检测抗体致敏红细胞方法的建立及初步应用[J]. 中国输血杂志,2002,15(2):98-100.

[4] 张弛,郭晓伟,向莹,等. 流式细胞术在人 ABO 血型特异性抗体检测中的应用[J]. 中华器官移植杂志,2011,32(1):24-27.

[5] Pins MR,Saidman SL,Cosimi AB,et al. Accelerated acute rejection of an apparent A2 renal allograft in an O recipient:report of a case with flow cytometric analysis[J]. Transplantation,1997,63(7):984-988.

[6] 尹凤媛,陈华波,刘居新,等. 两种方法测定孕妇 IgG 抗-A(B)效价的比较[J]. 中国输血杂志,2006,19(1):51-52.

[7] Cheng D,Hao Y. Comparative evaluation of the microcolumn gel card test and the conventional tube test for measurement of titres of immunoglobulin G antibodies to blood group A and blood group B[J]. J Int Med Res,2011,39(3):934-943.

[8] 孙小纯,欧兴义,林伟强,等. 孕妇 ABO 血型抗 A(B)抗体效价检测分析[J]. 国际检验医学杂志,2012,33(6):719-721.

[9] 杨秀丽. O 型孕妇血清中 IgG 抗体效价与新生儿溶血病的关系[J]. 国际检验医学杂志,2009,30(10):1037-1039.

[10] Stussi G,Huggel K,Lutz HU,et al. Isotype-specific detection of ABO blood group antibodies using a novel flow cytometric method[J]. Br J Haematol,2005,130(6):954-963.

[11] Yurugi K,Kimura S,Ashihara E,et al. Rapid and accurate measurement of anti-A/B IgG antibody in ABO-unmatched living donor liver transplantation by surface plasmon resonance[J]. Transfus Med,2007,17(2):97-106.

[12] Valli PV,Puga G,Yung Fehr T,et al. Changes of circulating antibody levels induced by ABO antibody adsorption for ABO-incompatible kidney transplantation[J]. Am J Transplant,2009,9(5):1072-1080.

(收稿日期:2014-01-08)

(上接第 1915 页)

in Guangdong Province of China[J]. J Clin Pathol,2004,57(5):517-522.

[2] Xiong F,Sun M,Zhang X,et al. Molecular epidemiological survey of haemoglobinopathies in the Guangxi Zhuang Autonomous Region of southern China[J]. Clin Genet,2010,78(2):139-148.

[3] 周玉球,商璇,尹保民,等. 1998-2010 年珠海市地中海贫血大规模人群的遗传筛查和产前诊断结果分析[J]. 中华妇产科杂志,2012,47(2):90-95.

[4] 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,2006:99-112.

[5] 汪伟山,周玉球,张永良,等. 静止型 α -地中海贫血红细胞指标临界值的确定及其应用[J]. 国际检验医学杂志,2011,32(2):147-149.

[6] 熊立凡,刘成玉. 临床检验基础[M]. 4 版,北京:人民卫生出版社,2007:106-112.

[7] 程翔,乐家新,郝晓柯,等. 血浆渗透压升高对不同类型血细胞分析仪 MCV 测定结果的影响[J]. 中国误诊学杂志,2010,10(8):1765-1767.

[8] 赵花,李娇颖. 病毒性肝炎患者 MCV、RDW 的变化及临床意义[J]. 中国误诊学杂,2007,7(20):4742-4743.

[9] Yesil A,Senats E,Bayoglu IV,et al. Red cell distribution width:a novel marker of activity in inflammatory bowel disease[J]. Gut Liver,2011,5(4):460-467.

[10] Old JM. Screening and genetic diagnosis of haemoglobin disorders[J]. Blood Rev,2003,17:43-53.

(收稿日期:2014-02-18)