

· 论 著 ·

微柱凝胶技术在新生儿溶血病检测中的应用

吴晶晶, 袁万博, 谢思思, 肖秀林[△]

(荆州市中心医院检验医学部, 湖北荆州 434020)

摘要:目的 探讨微柱凝胶免疫技术在新生儿溶血病(HDN)筛查中的应用价值。方法 采用微柱凝胶技术对本院临床疑似 HDN 212 例患儿血液标本做直接抗人球蛋白试验、游离试验、放散试验。结果 疑似 HDN 患儿血液样本 212 例, 确诊为 HDN 50 例(23.6%), 其中 ABO-HDN 45 例(21.2%)、Rh-HDN 5 例(2.4%)。45 例 ABO-HDN 的患儿中, A 型 23 例, 阳性率为 36.5%(23/63); B 型 22 例, 阳性率为 28.2%(22/78)。3 项试验的检出敏感性: 50 例 HDN 确诊患儿中放散试验阳性率为 100%, DTA 阳性率为 28%, 游离试验阳性率为 92%。结论 微柱凝胶法能快速准确检测出 HDN, 具有操作简便、标本用量少、方法学敏感性高、特异性强, 可为 HDN 提供可靠诊断依据, 适用于临床推广应用。

关键词:微柱凝胶免疫技术; 新生儿溶血病; 直接抗人球蛋白试验; 游离试验; 放散试验

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.07.004

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)07-0872-03

Application of microcolumn gel technology in detection of neonatal hemolytic disease

Wu Jingjing, Yuan Wanbo, Xie Sisi, Xiao Xiulin[△]

(Department of Clinical Laboratory, Jingzhou Municipal Central Hospital, Jingzhou, Hubei 434020, China)

Abstract: Objective To investigate the application value of microcolumn gel technology in screening hemolytic disease of the newborns(HDN). **Methods** The direct antiglobulin test(DAT), antibody release test and free antibody test were performed in 212 cases of suspected HDN in our hospital by using microcolumn gel assay. **Results** In 212 cases of suspected HDN, 50 cases(23.6%) were diagnosed as HDN, including 45 cases(21.2%) of ABO-HDN and 5 cases(2.4%) of Rh-HDN. In 45 cases of ABO-HDN, 23 cases(36.5%) were A blood type and 22 cases(28.2%) were B blood type. The sensitivity of antibody release test, DAT and free antibody test was 100%, 28% and 92% respectively. **Conclusion** The microcolumn gel technology can detect HDN fastly and accurately, with the advantages of simple operation, less sample consumption, high sensitivity and specificity, which can provide reliable basis for HDN diagnosis and is worth popularizing and applying in clinic.

Key words: Microcolumn gel technology; Hemolytic disease of newborn; Direct antiglobulin test; antibody release test; free antibody test

新生儿溶血病(HDN)是指母婴血型不合引起的新生儿同种免疫性溶血, 是新生儿黄疸的主要原因。HDN 主要包括 ABO、Rh 及 MN 血型系统不合, 以 ABO 血型不合最常见。微柱凝胶技术(MGT)具有标本用量少、操作简单迅速、敏感性高且易判断结果等优点, 对 HDN 早期诊断和治疗具有重要的意义。本文对 2010 年 1 月至 2014 年 4 月本院送检的 212 例疑似新生儿溶血病患儿血液标本进行直接抗人球蛋白试验(DTA)、游离试验及放散试验(简称 3 项试验), 现将结果报道如下。

1 材料与方 法

1.1 标本来源 本院 2010 年 1 月至 2014 年 4 月新生儿病房中疑为 HDN 的患儿 212 例, 其中男 121 例, 女 91 例, 患儿出生时间为 30 min 至 23 d。每位患儿采集 EDTA-K₂ 抗凝全血 1.5~2.0 mL, 不抗凝静脉血 2.0~3.0 mL。

1.2 仪器与试剂 新生儿 ABO、RhD 血型检测卡(六孔分别为抗 A、抗 B、抗 AB、抗 D、阴性对照、IgG 即直接抗人球蛋白检测孔), 抗人球蛋白检测卡, 由长春博迅生物技术有限责任公司提供。0.5%~0.8% 标准 A、B、O 型红细胞悬液自行配制, 分别取 3 份 A 型、3 份 B 型、3 份 O 型红细胞混匀后用生理盐水

洗涤 3 次, 吸取末次洗涤后的压积红细胞用生理盐水配制成 0.5%~0.8% 的标准 A、B、O 型红细胞悬液。37℃ 微柱孵育器, 56℃ 水浴箱, BYL 型血型血清学多用离心机。

1.3 方 法

1.3.1 新生儿 ABO、RhD 血型及直接抗人球蛋白试验的检测 在准备好的血型检测卡上做好标记, 将待检者抗凝血标本配制的 0.5%~0.8% 红细胞悬液混匀后加入第一至第六微孔中, 每孔各 50 μL; 用血型血清学多用离心机离心 5 min(900 r/min 2 min, 1 500 r/min 3 min), 取出肉眼判定结果, 同时可以得出直接抗人球蛋白试验结果。

1.3.2 游离试验及放散试验 血清的制备: 不抗凝静脉血 2.0~3.0 mL, 离心, 取上清液(该上清液不得有絮状物或沉淀)。放散液的制备: 采用热放散法制备。取待检红细胞, 用生理盐水洗涤 4 次(以除去未结合的抗体), 取压积红细胞加入等量的生理盐水, 56℃ 水浴轻摇 10 min, 立即离心 3 000 r/min 2~3 min, 取上清液即为放散液。

1.3.3 取抗人球蛋白检测卡做好标记后, 1~3 孔分别加入 50 μL 的新生儿血清, 4~6 孔加入 50 μL 的放散液。将配制好的 0.5%~0.8% 的标准 A 型红细胞悬液分别加入 1 号、4 号孔; B

型红细胞悬液加入 2 号、5 号孔；O 型红细胞悬液加入 3 号、6 号孔，置 37℃ 微柱孵育器中孵育 15 min，取出用血型血清学多用离心机离心 5 min，肉眼判定结果。

1.3.4 结果判定方法 红细胞抗原与相应抗体在微柱凝胶中形成的特异性抗原抗体复合物浮在凝胶表面或胶中为阳性；微柱凝胶介质中未出现特异性抗原抗体复合物，红细胞沉于凝胶管尖底部为阴性。

1.3.5 HDN 的诊断标准 游离放散试验中，所检测的有临床意义的抗体即阳性结果必须是针对新生儿 RBC 血型抗原的 IgG 抗体，如 A 型检测出抗 A，B 型检测出抗 B，AB 型检测出抗 A、抗 B 或抗 AB，RhD 阳性检测出抗 D。3 项试验均阳性可确诊为 HDN，不同时为阳性者以放散试验阳性为诊断标准；DTA 和游离试验同时阳性时，也可确诊为 HDN；DTA 或游离试验单项阳性时可疑为 HDN，结合临床症状综合分析。

1.4 统计学处理 采用 SPSS20.0 软件进行数据处理及统计分析，计数资料以例数或百分率表示，组间比较采用 χ^2 检验， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 212 例疑似 HDN 患儿血样中，确诊为 HDN 50 例，总阳性率为 23.6%。 其中 ABO-HDN 45 例，阳性率为 21.2%；Rh-HDN 5 例，阳性率为 2.4%。

2.2 45 例 ABO-HDN HDN 患儿中，母亲血型均为 O 型 RhD 阳性，患儿血型为 A 型 23 例，在患儿血型为 A 型标本中的阳性率为 36.5% (23/63)；患儿血型为 B 型 22 例，在患儿血型为 B 型标本中的阳性率为 28.2% (22/78)，见表 1。 5 例 Rh-HDN HDN 患儿中，母亲为 RhD 阴性，患儿 RhD 阳性的 HDN 4 例；母亲为 RhE 阴性，患儿为 RhE 阳性的 HDN 1 例。

表 1 207 例疑似 ABO-HDN 患儿血型血清学检测结果

患儿血型	ABO-HDN				
	检测例数	DTA 阳性	游离试验阳性	放散试验阳性	确诊例数
A	63	8	25	23	23
B	78	1	26	22	22*
O	56	0	0	0	0
AB	10	0	0	0	0
合计	207	9	53	45	45

*：与 A 型患儿比较其阳性率差异无统计学意义 ($P > 0.05$)， $P = 0.293$ 。

2.3 212 例疑似 HDN 的血型血清学试验中 3 项试验均为阳性者 13 例，游离与放散试验同为阳性者 33 例，DTA 与放散试验同为阳性者 1 例，放散试验单项阳性者 3 例；HDN 可疑结果 9 例。50 例 HDN 确诊标本中放散试验阳性率为 100%，DTA 阳性率为 28%，游离试验阳性率为 92%，见表 2。

表 2 212 例疑似 HDN 患儿标本 3 项试验检测

结果的分布及结果判断

组别	DTA	游离试验	放散试验	n	结论
1	+	+	+	13	确诊
2	-	+	+	33	确诊

续表 2 212 例疑似 HDN 患儿标本 3 项试验检测结果

组别	DTA	游离试验	放散试验	n	结论
3	+	-	+	1	确诊
4	-	-	+	3	确诊
5	+	+	-	0	确诊
6	-	+	-	9	可疑
7	+	-	-	0	可疑
8	-	-	-	153	排除

3 讨 论

HDN 是当胎儿血型与母亲不合或是继承了父亲方面的一些母亲没有的红细胞抗原时，胎儿红细胞进入母体循环，刺激母体产生相应的抗体，这种抗体的性质为 IgG 类免疫性抗体，能够通过胎盘作用于胎儿红细胞，使之出现不同程度的黄疸、贫血、水肿、肝脾肿大，甚至死胎、新生儿死亡等溶血病的症状和合并症。因此，HDN 血型血清学检测对准确的诊断 HDN 及防治均有重要的临床意义^[1]。传统试管法抗人球蛋白试验操作过程中需反复洗涤红细胞，步骤繁琐，受人为因素影响大；而微柱凝胶免疫技术可发现传统试验方法无法检测到的较弱抗原抗体结合反应，减少人为因素的误差，操作简单快速，标本用量少，特异性强^[1-5]。目前微柱凝胶免疫技术作为常规血型血清学检测技术已在本院广泛应用，其原理是若红细胞与相应的抗体结合后，在微柱凝胶管里形成凝集，在一定的离心力作用下，凝集团位于凝胶表面或胶中；若红细胞与相应的抗体未结合则红细胞沉至凝胶底部。

在已发现的人类 26 个血型系统中，以 ABO 血型不合最常见，主要发生于母亲为 O 型，而患儿为 A 型或 B 型；40%~50% 的 ABO-HDN 发生在第一胎，患儿出生后 24~36 h 内出现黄疸，临床表现较轻；其次为 Rh 血型不合，Rh 血型系统在红细胞膜上有 5 种抗原：C、D、E、c、e，抗原强弱依次为 D>E>C>c>e，故以 RhD 溶血病最常见，一般发生在第二胎，患儿出生后 24 h 内即出现黄疸，临床表现较重，且随胎次增加而加重^[6]。本研究采用微柱凝胶法对 212 例疑似 HDN 的患儿血液标本进行检测，确诊为母婴 ABO 血型不合引起的 HDN 为 45 例，占总送检标本的 21.2%；其中母亲血型 O 型，患儿为 A 型，HDN 的检出率为 36.5% (23/63)；母亲血型为 O 型，患儿为 B 型，HDN 的检出率为 28.2% (22/78)。两组结果比较显示，A 型患儿与 B 型患儿其 ABO-HDN 的检出率差异无统计学意义 ($P > 0.05$)^[1,7]。

212 例疑似 HDN 患儿血样中，确诊为 ABO-HDN 45 例，在 ABO-HDN 患儿中，DTA 阳性 9 例 (20.0%)，游离试验阳性 42 例 (93.3%)，放散试验阳性 45 例 (100%)；确诊 Rh-HDN 5 例，在 Rh-HDN 患儿中，DTA 阳性 5 例 (100%)，游离试验阳性 4 例 (80.0%)，放散试验阳性 5 例 (100%)。检测结果显示，直接抗人球蛋白试验在 ABO-HDN 中的检出率较低，而在 Rh-HDN 中的检出率为 100%，因 ABO 血型不合引起的 HDN 患儿体内 IgG 类抗体只与 A、B 红细胞抗原反应且密度较低，而 Rh 血型不合引起的 HDN 患儿体内 IgG 类抗体则可能与 A、B、O 3 种红细胞抗原均反应，故 ABO 系统引起的 HDN 直接抗人球蛋白试验阳性强度较弱，Rh 系统引起的 HDN 直接抗

人球蛋白试验阳性强度较强,直接抗人球蛋白试验对区别 ABO-HDN 和 Rh-HDN 有重要作用^[8-9]。游离试验是检测新生儿血清中是否存在与自身红细胞不匹配的 IgG 抗 A、B 或是 ABO 系统以外的抗体,该试验阳性提示继续溶血的可能;因为产妇在分娩前后,患儿致敏红细胞破坏加速,而患儿的游离抗体也只在出生后几天内存在。因此,有新生儿黄疸症状的患儿标本应尽早送检,以提高阳性检出率^[10-11]。本院送检的 HDN 标本其患儿出生时间为 30 min 至 23 d,出生后 4 天内阳性检出率最高,随着时间的延长阳性检出率逐渐下降。放散试验是先将新生儿红细胞表面可能结合的抗体释放出来,再进行间接抗人球蛋白试验;因有大量压积红细胞释放使抗体浓缩提高检出率,所以放散试验是 3 项试验中敏感性最高的,此试验一旦出现阳性结果就表明患儿红细胞上覆有 IgG 类血型抗体,即可明确诊断为 HDN^[12-13]。

本研究中有一例母婴血型均为 O 型、RhD 阳性且临床症状较重的病例,其 HDN 3 项试验均为阳性,为研究患儿是何种原因引起的 HDN,故用 Rh 血型抗原检测卡分别检测母婴的 Rh 血型抗原,其中母亲 RhD(+),RhC(+),Rhc(+),RhE(-),Rhe(+);患儿 RhD(+),RhC(+),Rhc(+),RhE(+),Rhe(+);由此可见是患儿与母亲 RhE 血型不合引起的 HDN。

由于 HDN 患儿通常病情危急,需要尽快明确诊断,故标本采集后要尽早送检,红细胞标本一定不能被细菌污染,否则易出现微柱法检测假阳性结果;血清标本必须充分去除纤维蛋白,以免阻碍阴性红细胞沉淀,呈假阳性反应;应严格按试验的质量控制程序进行操作,避免干扰因素、交叉反应及潜在误差来源对结果造成影响。

综上所述,将微柱凝胶免疫技术应用到 HDN 的检测中,能对 HDN 进行准确而快速地诊断,有利于给予患儿及时有效的治疗,具有良好的临床应用价值。

参考文献

[1] 卢磊,刘燕.微柱凝胶技术在新生儿溶血病检测中的应用[J].中

国现代医生,2010,48(1):38-39.
 [2] 唐任光,黄庆,李荣颜,等.微柱凝胶卡式法和传统试管法检测新生儿溶血病 3 项结果的比较[J].中国输血杂志,2009,22(11):913-914.
 [3] 王滨芬.微柱凝胶技术在新生儿溶血病检测中的应用[J].中外健康文摘,2010,7(1):83-84.
 [4] 钟月华,谭静,黄华华,等.微柱凝胶技术在新生儿溶血性疾病诊断中的应用[J].临床和实验医学杂志,2011,10(8):613-614.
 [5] Shin SY,Kwon KC,Koo SH,et al. Evaluation of two automated instruments for pre-transfusion testing: AutoVue Innova and Techno TwinStation[J]. Korean J Lab Med, 2008, 28(3): 214-220.
 [6] 丛玉隆,王鸿利,仲人前,等.实用检验医学上册[M].北京:人民卫生出版社,2009:246.
 [7] 陈昌达,李就文,陈超群,等.微柱凝胶技术检测红细胞免疫性抗体的临床应用[J].分子诊断与治疗杂志,2010,5(2):342-343.
 [8] 邓想民,刘丙现,雷菊花.132 份母婴 ABO 血型不合新生儿溶血样本检测结果[J].实用医技杂志,2007,14(6):743-744.
 [9] 刘达庄.免疫血液学[M].上海:上海科学技术出版社,2002:136.
 [10] 杨文勇,和润泞,蔡德康.血型血清学诊断 ABO 新生儿溶血病的实验研究[J].医学理论与实践,2012,25(8):892-894.
 [11] 李勇,马学严.实用血液免疫学血型理论和实验技术[M].北京:科学出版社,2006:420-421.
 [12] 高峰.输血与输血技术[M].北京:人民卫生出版社,2003:101.
 [13] Brumit MC,Stubbs JR. Conventional tube agglutination with polyethylene glycol versus Red Cell Affinity Column Technology (ReACT): a comparison of antibody detection methods[J]. Ann Clin Lab Sci, 2002, 32(2): 155-158.

(收稿日期:2014-12-15)

(上接第 871 页)

性别、年龄、体质量等因素进行了相关性分析,发现性别、年龄、体质量与 CD34⁺ 细胞百分比呈负相关($P < 0.05$),白细胞计数呈正相关($P < 0.01$),即在一定范围内男性供者优于女性供者,年龄越小、体质量越轻,白细胞计数越高,经 G-CSF 动员的外周血造血干细胞 CD34⁺ 细胞百分比越高。

综上所述,在采用 G-CSF 动员外周血造血干细胞的过程中,外周血 T 淋巴细胞亚群、血常规与动员前相比差别明显,而在动员后采集过程中则无明显差别。同时在一定范围内男性供者优于女性供者,年龄越小、体质量越轻,白细胞计数越高,经 G-CSF 动员的外周血造血干细胞 CD34⁺ 细胞百分比越高。

参考文献

[1] 王存邦,陈幸华,等. G-CSF 对不同人群 CD34 细胞及 T 细胞亚群影响的动态变化研究[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(12): 1271.
 [2] Fruehauf S, Veldwijk M R, Kramer A, et al. Delineation of cell cycle state and correlation to adhesion molecule expression of human

CD34 cells from steady state bone marrow and peripheral blood mobilized following G · CSF · supported chemotherapy Stem Cells, 1998, 16(2): 271-279.
 [3] 李强,张之南,潘华珍. CD34 抗原的结构、功能和临床应用[J]. 中华血液学杂志, 1997, 18(5): 278-281.
 [4] 白海,达万明,欧英贤. 造血干细胞研究进展[J]. 西北国防医学杂志, 2000, 21(1): 3-5.
 [5] Duhrsen U, Villeval, Boya J, et al. Effects of recombinant human granulocyte colony stimulating factor on hematopoietic progenitor cells in c~cer patients[J]. Blood, 1988, 72(20): 2074-2081.
 [6] 唐纬,沈志祥. 造血干细胞移植的临床应用[M]. 血液肿瘤学. 北京:人民卫生出版社, 1999: 130-138.
 [7] Sudhir S, Thomas A, Vowells S, et al. Granulocyte colony-stimulating factor recruitment of CD34 progenitors to peripheral blood: impaired mobilization in chronic granulomatous disease and adenosine deaminase-deficient severe combined immunodeficiency disease patients[J]. Blood, 1996, 88(10): 1104-1112.

(收稿日期:2014-11-10)