

学术会议优秀论文选登 ·

国产微柱凝胶免疫检测试剂卡检测孕妇 IgG 血型抗体效价的实验研究

李凌波 王冬倩 陈云声 李 宁 陈维佳 (长春博讯生物技术有限责任公司, 长春 130012)

中国图书分类号 R446.61 文献标识码 A 文章编号 1000-484X(2008)12-1138-04

[摘要] 目的:比较微柱凝胶抗人球蛋白试验和传统试管抗人球蛋白试验检测 O 型孕妇血清中 IgG 抗-A 和抗-B 效价的差异,对国产微柱凝胶试剂卡检测孕妇 IgG 效价的决定值进行界定。方法:用国产微柱凝胶试剂卡和传统试管法平行检测 524 例丈夫为 A 型或 B 型的 O 型孕妇血清 IgG 抗-A 和抗-B 水平,经配对 t 检验、 χ^2 检验和回归分析,比较两种方法检测结果的差异并界定前者的决定值。结果:国产微柱凝胶试剂卡和传统试管法检测抗-A 平均效价分别为 249.98 和 120.85,抗-B 为 156.98 和 76.38,前一方法分别是后者 2.07、2.06 倍,差异均有显著性意义 ($t = 19.64, P < 0.001; t = 15.39, P < 0.001$);相关性分析得出两种方法测抗-A、抗-B 效价均有高度的相关性,相关系数 r 分别是 0.885 7 ($t = 30.76, P < 0.001$)、0.899 6 ($t = 33.22, P < 0.001$),通过回归方程得出国产微柱凝胶试剂卡检测抗-A、抗-B 效价的决定值分别为 128、116;以 IgG 抗体效价 ≥ 64 判为阳性,国产微柱凝胶试剂卡测抗-A、抗-B 阳性率分别为 73.66%、52.29%,明显高于传统试管法的 47.33%、34.35%,均具有统计学意义 ($\chi^2 = 69.00, P < 0.01; \chi^2 = 47.00, P < 0.01$)。结论:国产微柱凝胶试剂卡比传统试管法操作更简便、快捷,应用于孕妇产前 IgG 抗-A、抗-B 效价检测比后者具有更高的灵敏度,对其决定值的界定,将为临床提供更可靠的诊断依据。

[关键词] 微柱凝胶抗人球蛋白试验;试管抗人球蛋白试验;IgG 抗体效价

Empirical study of titration of IgG antibody against blood group in pregnant women by using domestic microcolumn gel Coombs' test

LI Ling-Bo, WANG Dong-Qian, CHEN Yur-Sheng, LI Ning, CHEN Wei-Jia. Changchun Bioxun Biotechnology Limited Company, Changchun 130012, China

[Abstract] **Objective:** To compare microcolumn gel Coombs test and test tube Coombs test for IgG anti-A and anti-B titre in serum of pregnant women with blood type O. The critical titre for IgG anti-A and anti-B should be established in domestic microcolumn gel Coombs' test. **Methods:** 524 blood samples of pregnant women with blood type O, whose husbands were of blood type A or B, were detected simultaneously by domestic microcolumn gel Coombs' test and test tube Coombs test. The results were analyzed using paired " t " test, " χ^2 " test and regression analysis. **Results:** IgG anti-A mean titres determined by the two methods separately were 249.98 and 120.85, and IgG anti-B mean titre were 156.98 and 76.38. IgG anti-A and anti-B titration in domestic microcolumn gel Coombs' test showed significantly higher titres (mean 2.07 fold and mean 2.06 fold) than in test tube Coombs test in all samples studied ($t = 19.64, P < 0.001$ and $t = 15.39, P < 0.001$). The two methods had a high correlation, and the coefficient of correlation between the two methods for IgG anti-A and anti-B separately were 0.885 7 ($P < 0.001$) and 0.899 6 ($P < 0.001$). Based on regression equation, the critical titre for IgG anti-A and anti-B in domestic microcolumn gel Coombs' test separately were 128 and 116. IgG anti-A and anti-B antibody titre exceeding 64 was designed as positive. The positive rates of IgG anti-A determined by the two methods were 73.66%、47.33% separately, and those of IgG anti-B were 52.29%、34.35% separately, where significantly statistical difference was found between the two methods ($\chi^2 = 69.00, P < 0.01; \chi^2 = 47.00, P < 0.01$). **Conclusion:** Domestic microcolumn gel Coombs' test is superior to test tube Coombs test. It has the further advantage of rapid, simple and sensitive for determination of IgG level of specific antibodies in serum of the pregnant. The critical titre should be established in view of the high sensitivity of domestic microcolumn gel Coombs' test, which provides a reliable parameter for clinical diagnosis.

[Key words] Microcolumn gel Coombs test; test tube Coombs test; IgG antibody titre

胎儿及新生儿溶血病 (Haemolytic disease of the fetus and the newborn, HDN) 包括 Rh 血型及 ABO 血型等溶血病,后者在我国较为常见。测定孕妇血清中 IgG 类抗-A 和抗-B 效价是预测和判断 ABO-HDN 发

生的重要依据^[1]。常用方法是传统的试管抗人球蛋白试验 (Test tube Coombs test, TT-Coombs' T)。微柱凝胶抗人球蛋白试验 (Microcolumn gel Coombs test, MG-Coombs' T) 因快速、敏感、简便、结果直观,应用日益广泛。本研究分别采用试管抗人球蛋白试验法和国产微柱凝胶免疫检测试剂卡检测孕妇血型 IgG 抗体

作者简介:李凌波(1976年-),男,硕士,助理研究员,主要从事血液免疫学研究, E-mail: lilingbo@bioxun.com。

水平,比较两法测孕妇 IgG 效价的差异,为试剂卡的应用提供有意义的测母体 IgG 抗体效价的检验标准。

1 材料与方法

1.1 研究对象 来自杭州艾迪康医学检验中心,妊娠 12~40 周,血型为 O 型 RhD 阳性孕妇血清 524 例,配偶均为非 O 型 RhD 阳性者,其中丈夫血型为 A 型、B 型各 262 例。

1.2 试剂及仪器 MG Coombs[®] 试剂卡、抗人球蛋白试剂(羊免疫血清)、ABO 血型反定型用红细胞试剂盒(4%标准红细胞)、ABO 血型反定型用红细胞试剂盒(0.8%标准红细胞)、0.2 mol/L 巯基乙醇(2-ME)实验用试剂,以上均由长春博迅生物技术有限责任公司生产;微柱凝胶免疫分析技术专用离心机和孵育器由长春博研医学生物仪器公司生产;DK-600 型电热恒温水槽由上海申贤恒温设备厂生产。

1.3 方法

1.3.1 标本预处理 400 μ l 血清标本和 400 μ l 0.2 mol/L 2-ME 应用液(2-ME 用前摇匀)充分混匀,试管口以石蜡封口膜封紧,置 37[°] 水浴 60 分钟,充分裂解血清中 IgM 类抗体,并采用单克隆抗-A、抗-B 做灭活对照。吸经 2-ME 处理的血清用 pH 7.0~7.4 生理盐水做倍比稀释,稀释度分别为 1 2、1 4、1 8、1 16、1 32、1 64、1 128、1 256、1 512、1 1 024、1 2 048。用盐水法确定 1 2 稀释度管 IgM 抗体已被破坏,分别测 IgG 抗-A、抗-B 效价,且均取双管做平行试验。

1.3.2 MG Coombs[®] T 取 MG Coombs[®] 试剂卡做好标记,在微管内各加入 50 μ l 与孕妇丈夫同型的 0.8%标准红细胞悬液(测定孕妇 ABO 系统 IgG 血型抗体),再依次加入上述处理的稀释度为 1 2、1 4、

1 8、1 16、1 32、1 64、1 128、1 256、1 512、1 1 024、1 2 048 的血清 50 μ l,置专用孵育器内 37[°] 孵育 15 分钟,再放入专用离心机内离心 5 分钟(900 r/min,2 分钟,1 500 r/min,3 分钟)。结果以出现 1+凝集的最高稀释度的倒数为抗体效价。

1.3.3 TF Coombs[®] T 取经 2-ME 处理的 1 2、1 4、1 8、1 16、1 32、1 64、1 128、1 256、1 512、1 1 024、1 2 048,11 个稀释度的血清各 100 μ l,用 4%A 型、B 型标准红细胞悬液,抗人球蛋白试剂做 IgG 抗-A、抗-B 效价的测定^[2]。结果以肉眼观察产生 1+凝集的最高稀释度的倒数为抗体效价。

1.4 统计学处理 采用 Excel 统计软件进行数据处理分析,抗体效价先做对数转换,MG Coombs[®] T 与 TF Coombs[®] T 效价比较采用配对 *t* 检验,并进行直线相关性分析。阳性检出率比较采用四格表配对资料² 检验验证。

2 结果

2.1 两种方法测定 524 例标本效价均值比较

2.1.1 两种方法测定 262 例标本 IgG 抗-A 效价均值比较 MG Coombs[®] T 测定 262 例标本 IgG 抗-A 效价几何均数为 249.98,是 TF Coombs[®] T 几何均数 120.85 的 2.07 倍。MG Coombs[®] T 测定 262 例标本效价均值明显高于 TF Coombs[®] T,差异有显著性意义($t=19.64, P<0.001$)。两种方法测定 262 例标本 IgG 抗-A 效价分布见表 1。

2.1.2 两种方法测定 262 例标本 IgG 抗-B 效价均值比较 MG Coombs[®] T 测定 262 例标本 IgG 抗-B 效价几何均数为 156.98,是 TF Coombs[®] T 几何均数 76.38 的 2.06 倍。MG Coombs[®] T 测定 262 例标本效价均值明显高于 TF Coombs[®] T,差异有显著性意义($t=15.39, P<0.001$)。两种方法测定 262 例标本

表 1 两种方法测定 262 例标本 IgG 抗-A 效价分布

Tab.1 Distributions of the determination of anti-A IgG titres with two assays in 262 pregnant women

Methods	n	Titres										
		4	8	16	32	64	128	256	512	1 024	2 048	4 096
MG Coombs [®] T	262	0	3	28	38	57	54	46	21	8	3	4
TF Coombs [®] T	262	2	5	62	69	54	39	16	5	7	3	0

表 2 两种方法测定 262 例标本 IgG 抗-B 效价分布

Tab.2 Distributions of the determination of anti-B IgG titres with two assays in 262 pregnant women

Methods	n	Titres										
		4	8	16	32	64	128	256	512	1 024	2 048	4 096
MG Coombs [®] T	262	2	10	57	56	43	42	26	16	7	2	1
TF Coombs [®] T	262	7	10	90	65	44	26	14	3	1	2	0

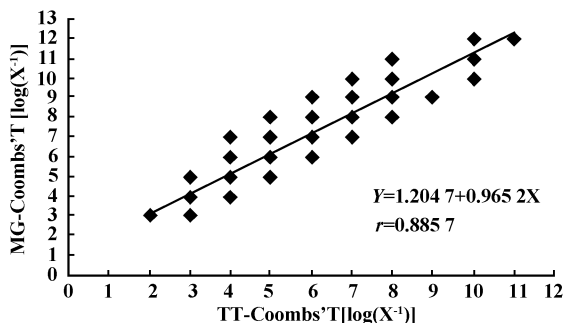


图 1 MG Coombs 'T 与 TF Coombs 'T 检测 IgG 抗-A 的相关性

Fig.1 Relationship between MG Coombs 'T and TF Coombs 'T for IgG anti-A

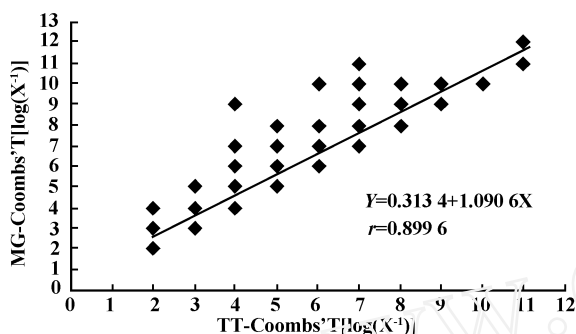


图 2 MG Coombs 'T 与 TF Coombs 'T 检测 IgG 抗-B 的相关性

Fig.2 Relationship between MG Coombs 'T and TF Coombs 'T for IgG anti-B

IgG 抗-B 效价分布见表 2。

2.2 两种方法相关性分析

2.2.1 两种方法测 IgG 抗-A 效价相关性分析

MG Coombs 'T 与 TF Coombs 'T 检测 IgG 抗-A 效价结果高度相关,相关系数(r)为 0.8857(对相关系数进行 t 检验: $t = 30.76$,而 $t_{0.001/2,200} = 3.340$, $P < 0.001$),具有统计学意义。回归方程式为 $Y = 1.2047 + 0.9652X$,见图 1。以 TF Coombs 'T IgG 抗-A 效价 64 为具有临床意义决定值,根据回归方程计算, MG Coombs 'T 具有临床意义决定值的效价为 127.6368,约取值为 128。

2.2.2 两种方法测 IgG 抗-B 效价相关性分析

MG Coombs 'T 与 TF Coombs 'T 检测 IgG 抗-B 效价结果高度相关,相关系数(r)为 0.8996(对相关系数进行 t 检验: $t = 33.22$,而 $t_{0.001/2,200} = 3.340$, $P < 0.001$),具有统计学意义。回归方程式为 $Y = 0.3134 + 1.0906X$,见图 2。以 TF Coombs 'T IgG 抗-B 效价 64 为具有临床意义决定值,根据回归方程计算, MG

Coombs 'T 具有临床意义决定值的效价为 115.9211,约取值为 116。

2.3 两种方法阳性检出率的比较

2.3.1 两种方法测 IgG 抗-A 阳性检出率的比较

以临床上有意义的 IgG 抗-A 效价 64 判为阳性, MG Coombs 'T 与 TF Coombs 'T 检出 IgG 抗-A 阳性例数及百分率分别为 193(73.66%)、124(47.33%), MG Coombs 'T 检测 IgG 抗-A 阳性率明显高于 TF Coombs 'T,具有统计学意义(自由度 = 1, $\chi^2 = 69.00$, $P < 0.01$)。

2.3.2 两种方法测 IgG 抗-B 阳性检出率的比较

以临床上有意义的 IgG 抗-B 效价 64 判为阳性, MG Coombs 'T 与 TF Coombs 'T 检出 IgG 抗-B 阳性例数及百分率分别为 137(52.29%)、90(34.35%), MG Coombs 'T 检测 IgG 抗-B 阳性率明显高于 TF Coombs 'T,具有统计学意义(自由度 = 1, $\chi^2 = 47.00$, $P < 0.01$)。

3 讨论

HDN 最基本的病因是胎母血型不合的胎儿红细胞进入母体,刺激母体产生 IgG 类免疫性抗体,该类抗体能通过胎盘与胎儿红细胞结合并使之破坏而发生溶血,这种自限性免疫溶血性疾病常可导致胎儿贫血、水肿、流产、早产,严重者将造成新生儿生理缺陷甚至死亡。目前已报道有 43 种以上的不同红细胞抗原与 HDN 有关^[3],但又以 ABO 血型不合 HDN 最为常见,其次为 Rh 血型系统,其他血型系统导致的 HDN 较为少见^[4,5]。由于我国汉族人口中 RhD 阴性人群只占 0.34%,因而, ABO-HDN 在临床最为常见,这其中 O 型个体血液中除含有 IgM 抗-A 和抗-B 抗体外,同时含有较多的 IgG 抗-A 和抗-B 抗体。有研究表明 ABO-HDN 的发病程度与母体内 IgG 抗-A、抗-B 的效价有一定相关性,随其水平的升高而递增^[1,6],如果母体内 IgG 抗-A、抗-B 的效价随着孕期的增长而增高,则提示胎儿 HDN 的可能性增大^[7]。一般认为,孕妇血清中 IgG 抗-A 或抗-B 效价 64^[2,8],则胎儿有可能受害,如果其水平持续性升高,应及时采取临床措施以降低孕妇体内 IgG 抗体效价。因此有专家建议,在孕第 16 周、28 周、36 周时应各做一次血型免疫性抗体筛选并测定其滴度,以评估抗体水平并动态监测其变化^[9]。

目前实验室常用于检测孕妇血清 IgG 抗-A、抗-B 水平的方法是传统的 TF Coombs 'T,半个多世纪以来,该试验始终是最经典、最准确的检测 IgG 类不完全抗体的方法,但因其操作繁琐,反应时间较长,不

适用于大批量样本的检测,始终未能在临床常规应用,只能对已经经过其他筛检试验的少量阳性标本进行确定性试验。1990年,Y. Lapiere 发表文章介绍了一项免疫学检测新技术:将抗原抗体反应与凝胶分子筛技术相结合,即微柱凝胶免疫实验^[10]。该技术的本质是血凝试验,即红细胞抗原抗体在微柱腔内的凝胶介质中发生肉眼可见的免疫凝集反应。MG Coombs 'T 孵育后的红细胞不需三洗,且该法孵育时间只需 15 分钟,具有操作简便、影响因素少、结果可保存等优点,尤其提高了免疫凝集试验的敏感性^[11],使其能更广泛地应用在临床免疫检验中。

当前,以微柱凝胶技术为代表的一批微试管柱凝集技术在国外已成为常规的红细胞血型血清学检测方法^[12]。国内应用的微柱凝集检测技术主要有采用凝胶凝集技术的 DiaMed、Diana,采用玻璃珠柱凝集技术的 BioVue,以及国产 Bioxun 微柱凝胶免疫检测试剂卡等,有研究表明前三者检测孕妇血清 IgG 抗-A、抗-B 水平均显著高于传统试管法^[13-15]。本文对 524 例 O 型孕妇血清检测结果显示,在测 IgG 抗-A 和抗-B 效价时,分别得出 MG Coombs 'T 所得均值是 TT-Coombs 'T 的 2.07 倍和 2.06 倍,MG Coombs 'T 显著高于 TT-Coombs 'T,并且这两种方法检测抗-A 阳性例数(效价 64)百分率分别为 73.66%、47.33%,检测抗-B 分别为 52.29%、34.35%,两种检测方法中,阳性检出率也是前者明显高于后者。本研究结果说明,我们以国产微柱凝胶免疫检测试剂卡进行 MG Coombs 'T 检测 IgG 抗-A 和抗-B 效价,其检测灵敏度显著高于平行进行的传统 TT-Coombs 'T,但二者存在高度的相关性。

临床以 TT-Coombs 'T 测得效价 64 作为采取干预措施的决定值,由于微柱凝集检测技术大多具有更高的灵敏度,若以传统 TT-Coombs 'T 的诊断标准将会导致对患病风险的过高评估。因此有专家建议^[13,15,16],以微柱凝胶技术检测 IgG 抗-A、抗-B 效价时,应重新界定其具有临床意义的决定值,避免临床造成误诊。根据本研究中回归方程计算,国产 Bioxun 微柱凝胶免疫检测试剂卡测 IgG 抗-A 和抗-B 的决定值分别为 128、116。本研究表明国产微柱凝胶试剂卡比传统试管法操作更简便、快捷,应用于孕妇产前 IgG 抗体效价检测比后者具有更高的灵敏

度,以试管法为“金标准”确定国产微柱凝胶试剂卡的决定值,将会更好的辅助临床在 HDN 的产前预测与诊断上形成最接近实际情况的判断,为微柱凝胶检测技术这一优越方法的国产化及其普及创造条件。

4 参考文献

- Hadley A G. Laboratory assays for predicting the severity of haemolytic disease of the fetus and newborn[J]. *Transpl Immunol*, 2002; 10(2-3): 191-198.
- 叶应妩,王毓三,申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 第 3 版. 北京:中华人民共和国卫生部医政司, 2006: 257-266.
- 胡亚美,江载芳,诸福堂. 实用儿科学[M]. 第 7 版. 北京:人民卫生出版社, 2003: 477-480.
- Novaretti M C, Jens E, Pagliarini T *et al.* Hemolytic disease of the newborn due to anti-U[J]. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo*, 2003; 58(6): 320-323.
- Kim W D, Lee Y H. A fatal case of severe hemolytic disease of newborn associated with anti-Jkb[J]. *J Korean Med Sci*, 2006; 21(1): 151-154.
- Hadley A G. A comparison of in vitro tests for predicting the severity of haemolytic disease of the fetus and the newborn[J]. *Vox Sang*, 1998; 74 (Suppl 2): 375-383.
- 李勇,杨贵贞主编. 人类红细胞血型学实用理论与实验技术[M]. 北京:科学技术出版社, 1999: 174-176.
- 曹琼,兰炯采. 新生儿溶血病的产前诊断方法研究进展[J]. *中国输血杂志*, 2003; 16(1): 67-68.
- Moise KJ Jr. Changing trends in the management of red blood cell alloimmunization in pregnancy[J]. *Arch pathol Lab Med*, 1994; 118: 421-424.
- Lapiere Y, Rigal D, Adam J *et al.* The gel test: a new way to detected cell antigen-antibody reactions[J]. *Transfusion*, 1990; 30(2): 109-113.
- Novaretti M C, Jens E, Pagliarini T *et al.* Comparison of conventional tube test with diamed gel microcolumn assay for anti-D titration[J]. *Clin Lab Haematol*, 2003; 25: 311-315.
- 武建. 柱凝集技术的临床应用及其实验研究现状[J]. *中国输血杂志*, 2003; 16(5): 369-370.
- 李建新,吴夏枫,陈梅莲 *et al.* 抗人球蛋白微柱凝胶法和试管法检测孕妇 IgG 抗 A(B) 的比较[J]. *临床检验杂志*, 2006; 24(3): 213-214.
- 吴定昌,江慧. 微柱凝胶法检测 201 例孕妇 ABO 血型抗体效价结果分析[J]. *江西医学检验*, 2007; 25(1): 91, 82.
- 何静,陈方祥,刘建忠 *et al.* BioVue 微柱凝胶法检测孕妇产前抗体效价分析[J]. *重庆医学*, 2007; 36(24): 2482-2483.
- 张庆侠,郝建华,倪琳婷 *et al.* 三种方法检测孕妇血清 IgG 抗 A(B) 效价的结果比较[J]. *实用医技杂志*, 2008; 15(5): 555-556.

[收稿 2008-05-23 修回 2008-08-18]

(编辑 许四平)