

# 微柱凝胶法检测孕妇血清 IgG 抗体效价参考值的临床研究

罗国胜<sup>1</sup> 朱彩云<sup>1</sup> 席雅娟<sup>1</sup> 魏玉娥<sup>1</sup> 吴湘兰<sup>2</sup> 冯春颜<sup>1</sup> 李凌波<sup>3▲</sup>

1.广东省深圳市龙华新区人民医院检验科,广东深圳 518109;2.广东省深圳市龙华新区人民医院新生儿科,广东深圳 518109;3.长春博迅生物技术有限责任公司研发部,吉林长春 130012

**[摘要]** 目的 探讨使用微柱凝胶抗人球法建立 O 型孕妇血清 IgG 抗 A(B)效价的参考值。方法 选择 2011 年 10 月~2013 年 12 月在深圳市龙华新区人民医院就诊的夫妇 ABO 血型不合 O 型孕妇 3038 例,采用国产微柱凝胶抗人球卡对孕妇(丈夫为 A 型、B 型、AB 型)作不规则抗体筛查和 IgG 抗 A(B)效价的测定,以 1+凝集强度的血清最高稀释倍数的倒数为效价,并与 209 例临床诊断为 ABO 血型不合溶血病(ABO-HDN)的新生儿做相关性分析。结果 206 例临床诊断为 ABO-HDN 新生儿的母体血清免疫性 IgG 抗体效价均  $\geq 256$ 。结论 国产微柱凝胶抗人球法检测孕妇血清 IgG 抗体效价的正常参考值应设为  $<256$  较为合理,对临床预测、诊断、防治 ABO-HDN 有实用意义。

**[关键词]** 微柱凝胶法;孕妇;IgG 抗体效价;新生儿溶血病

**[中图分类号]** R446.61 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-7210(2015)06(a)-0157-04

## Clinical research of reference value of maternal serum IgG antibody titer by microcolumn gel assay

LUO Guosheng<sup>1</sup> ZHU Caiyun<sup>1</sup> XI Yajuan<sup>1</sup> WEI Yume<sup>1</sup> WU Xianglan<sup>2</sup> FENG Chunyan<sup>1</sup> LI Lingbo<sup>3▲</sup>

1.Department of Clinical Laboratory, Longhua District People's Hospital of Shenzhen City, Guangdong Province, Shenzhen 518109, China; 2.Department of New Pediatric, Longhua District People's Hospital of Shenzhen City, Guangdong Province, Shenzhen 518109, China; 3.Department of Research and Development, Changchun Bioxun Biotechnology Limited Company, Jilin Province, Changchun 130012, China

**[Abstract] Objective** To investigate the reference value of IgG anti-A (B) titre in serum of pregnant women with blood type O by microcolumn gel Coombs' test. **Methods** 3038 pregnant women with couple abo-incompatibility from October 2011 to December 2013 in Longhua District People's Hospital of Shenzhen City were selected. The titers of irregular antibody and IgG anti-A(B) of those pregnant women (whose husband was A, B or AB blood type group) with O blood type were detected by domestic microcolumn gel Coombs' test cards. The titer of antibody was the reciprocal of highest dilution of serum 1+ agglutination. At the same time, the 209 cases of newborns with a clinical diagnosis of ABO-HDN were analyzed. **Results** The immune maternal serum IgG antibody titers of 206 cases of ABO-HDN newborn were  $\geq 256$ . **Conclusion** The normal reference values of domestic microcolumn gel Coombs' test cards maternal serum antibody titer should be  $<256$ . It has practical significance in clinical prediction, diagnosis, prevention and treatment of ABO-HDN.

**[Key words]** Microcolumn gel assay; Pregnant women; IgG antibody titer; Hemolytic disease of the newborn

新生儿溶血病(hemolytic disease of the newborn, HDN)是由于经胎盘传播的母体免疫球蛋白(Ig)G 抗体与胎儿红细胞上不同于母体(即遗传自父系)的抗原结合,结果导致胎儿和/或新生儿红细胞寿命缩短

**[基金项目]** 广东省深圳市宝安区科技计划项目(2012244)。

**[作者简介]** 罗国胜(1963.9-),男,江西九江人,副主任技师,主要从事血液学、输血及免疫血型血清学实验研究。

▲通讯作者

的一种疾病<sup>[1]</sup>。临床因母婴 ABO 血型不合引起的 HDN 最为常见,IgG 是唯一能通过胎盘进入胎儿血液循环的抗体,该抗体进入胎儿血液循环后破坏胎儿红细胞而致新生儿 ABO 溶血病(ABO-HDN),可出现胎儿黄疸、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。由于 ABO-HDN 的发病程度与母体内 IgG 抗 A(B)的效价有一定相关性<sup>[2-3]</sup>,因此可通过定期检测孕妇体内 IgG 抗 A(B)的效价来判断胎儿受累

情况,并根据 IgG 抗体水平及早采取相应的防治措施,这对优生优育、提高人口素质具有重要意义。本研究采用国产微柱凝胶试验技术对夫妇 ABO 血型不合的 3038 例 O 型孕妇检测其血清 IgG 抗 A(B)效价,并分析其与 209 例产后临床诊断为 ABO-HDN 新生儿的关系。现将研究结果报道如下:

## 1 对象与方法

### 1.1 研究对象

选择 2011 年 10 月~2013 年 12 月在广东省深圳市龙华新区人民医院(以下简称“我院”)产科门诊就诊的夫妇 ABO 血型不合 O 型孕妇 3038 例,夫妇血型为 A-O 型的 1355 例,B-O 型 1209 例,AB-O 型 474 例。孕妇年龄 17~44 岁,平均(27.6±1.1)岁,孕 16~40 周,上述所有孕妇均无输血史。孕妇 Rh(D)血型阴性 9 例,其余均为阳性,除 1 例血清不规则抗体筛查为阳性(后经鉴定为 IgG 抗 D 且效价<2)外,其余均为阴性,故本研究不考虑 ABO 血型系统以外 IgG 抗体的效价。上述 O 型血孕妇所分娩的新生儿 209 例,均以黄疸或进行性黄疸加重为主要症状,出生 72 h 后总血清胆红素水平平均 $\geq 257 \mu\text{mol/L}$ (15 mg/dL),临床诊断 ABO-HDN 依据文献<sup>[4-5]</sup>。

### 1.2 试剂和仪器

0.2 mol/L 2-ME 应用液、0.8%ABO 血型反定型试剂盒(人血红细胞)、ABO、RhD 血型定型检测卡(单克隆抗体)、抗人球蛋白检测卡(不规则抗体筛查)、HDN 母体 IgG 抗体效价检测卡均由长春博迅生物技术有限责任公司提供;不规则抗体检测试剂(人红细胞)由长春博德生物技术有限责任公司提供。以上所有试剂均在有效期内使用。FYQ 型免疫微柱孵育器、TD-3A 血型血清学离心机(长春博研科学仪器有限公司)、DK-600 型电热恒温水槽(上海申贤恒温设备厂)。

### 1.3 检测方法

1.3.1 母体血清不规则抗体筛查 采用抗人球蛋白检测卡(不规则抗体筛查)进行不规则抗体筛查,按厂家使用说明书进行操作和判读。

1.3.2 母体 IgG 抗 A(B)抗体效价检测 400  $\mu\text{L}$  血清标本与 0.2 mol/L 2-ME 应用液 400  $\mu\text{L}$  充分混匀,封口膜封紧试管口,37 $^{\circ}\text{C}$  60 min,充分裂解血清中 IgM 类抗体。标记两组 10 mm $\times$ 60 mm 的试管各 12 个,第

12 管为阴性对照(生理盐水),吸经 2-ME 处理后血清用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、1:1024、1:2048,用盐水法确定 1:2 稀释度管 IgM 抗体已被破坏<sup>[6-7]</sup>。以 HDN 母体 IgG 抗体效价检测卡检测 IgG 抗 A(B)血型抗体效价,取检测卡做好标记,在微管内各加入 50  $\mu\text{L}$  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),再依次加入处理过的稀释度为 1:2、1:4、1:8、1:16、1:32、1:64、1:128、1:256、1:512、1:1024、1:2048 的血清及阴性对照(生理盐水)各 50  $\mu\text{L}$ ,37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 15 min,专用离心机离心 5 min(900 r/min, 2 min;1500 r/min, 3 min)。以出现 1+凝集强度的血清最高稀释度为阳性判断标准,并以此血清稀释度的倒数为效价<sup>[6]</sup>。

1.3.3 O 型血孕妇所分娩的新生儿血清学检测 对新生儿进行 HDN 血型血清学三项试验(包括直接抗人球蛋白试验、游离抗体试验、抗体放散试验,分别简称“直抗试验”、“游离试验”、“放散试验”)均采用微柱凝胶技术。具体方法参照文献<sup>[3]</sup>。

1.3.4 通过新生儿溶血病 3 项试验判断 ABO-HDN 直抗试验以出现凝集为阳性,游离和放散试验以检出可以和新生儿红细胞反应的抗体为阳性,单项放散试验阳性及其他项目阳性同时合并放散试验阳性的结果均可判为 ABO-HDN,直抗及游离试验 1 项阳性只能判定为 ABO-HDN 可疑阳性,两者同时阳性可判为 ABO-HDN<sup>[8]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 O 型孕妇 IgG 抗 A(B)效价分布

3038 例 O 型孕妇中,IgG 抗体效价 $\geq 256$ (异常例数)者 1388 例,占 45.69%。其中,夫妇为 A-O 型的异常例数有 681 例,占总例数(1355 例)的 50.26%,夫妇 B-O 型的异常例数有 507 例,占总例数(1209 例)的 41.94%,夫妇 AB-O 型的异常例数有 200 例,占总例数(474 例)的 42.19%。见表 1。

### 2.2 临床诊断为 ABO-HDN 的新生儿血清学三项试验结果

临床诊断为 ABO-HDN 的新生儿血清学三项试验结果显示,209 例患者均为放散试验阳性,其次游离试验阳性率也高达 86.12%,而游离+放散+直抗实验阳性率为 32.54%。见表 2。

表 1 O 型孕妇 IgG 抗 A(B)效价分布[n(%)]

夫妇血型	例数	<64	64	128	256	512	$\geq 1024$
A-O 型	1355	223(16.46)	198(14.61)	253(18.67)	289(21.33)	174(12.84)	218(16.09)
B-O 型	1209	305(25.23)	186(15.38)	211(17.45)	176(14.56)	147(12.16)	184(15.22)
AB-O 型	474	106(22.36)	77(16.24)	91(19.21)	84(17.72)	50(10.55)	66(13.92)
合计	3038	634(54.31)	461(12.21)	555(15.40)	549(18.07)	371(12.21)	468(15.40)

表2 临床诊断 ABO-HDN 新生儿血清学三项试验结果

三项试验	阳性例数	百分率(%)
放散试验	209	100.00
直抗试验	62	29.67
游离试验	180	86.12
游离+放散	113	54.07
游离+放散+直抗	68	32.54

### 2.3 临床诊断为 ABO-HDN 的新生儿母体 IgG 抗体效价分布

209 例中效价  $\geq 256$  的有 206 例,另有 3 例合并有红细胞葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G-6-PD 酶)缺乏新生儿的母体 IgG 抗体效价均为 128。见表 3。

表3 临床诊断 ABO-HDN 新生儿母体 IgG 抗体效价分布

效价	例数	ABO-HDN
128	555	3(1.4)
256	549	55(26.3)
512	371	44(21.1)
$\geq 1024$	468	107(51.2)
合计	1943	209(100.0)

注: ABO-HDN: 新生儿 ABO 溶血病

### 3 讨论

母婴血型不合可以引起 HDN, 溶血结果可致胎儿及新生儿贫血及发生显著的新生儿黄疸, 严重黄疸引起的高胆红素血症是该病的常见并发症之一。早期严重的高胆红素血症可能引起核黄疸, 从而留下听力丧失、脑性瘫痪、智力发育障碍等后遗症, 给社会及家庭带来沉重负担。与 HDN 相关的血型抗原超过 50 种以上, 其中以 ABO-HDN 最为常见, 但大多数 ABO-HDN 症状较轻, 通常可表现为产后 24 h 内出现轻微黄疸, 但由于特定族群中二磷酸尿苷葡萄糖醛基转移酶基因启动子变异导致了亚洲部分国家高胆红素血症的高发<sup>[7]</sup>。

导致新生儿胆红素升高的原因有多种, 如 ABO 及 Rh 溶血症、G-6-PD 缺陷症、早产因素、败血症等。近年来有研究指出, 我国核黄疸的发生率高于西方国家, 且高胆红素血症导致核黄疸的新生儿中伴发 ABO 溶血的概率为 29.9%<sup>[9]</sup>, 可见母婴 ABO 血型不合溶血病是胆红素升高的主要病因。另据报道, 我国 ABO-HDN 约占新生儿溶血病的 85.3%<sup>[5]</sup>, ABO-HDN 治疗的重点是降低血清胆红素, 防止核黄疸的发生<sup>[4]</sup>。一般认为, 在产前通过测定孕妇血清中的免疫性抗体效价是预测母婴血型不合溶血病发生及程度的重要依据之一<sup>[2-3]</sup>, 本研究显示, 采用国产微柱凝胶试验技术对夫妇 ABO 血型不合的 3038 例 O 型孕妇产前检测其血清 IgG 抗 A(B)效价, 效价  $\geq 256$  的为 1388 例, 占 45.69%, 与姚文娟等<sup>[10]</sup>的研究结果 48.60% 相接近。产后临床诊断为 ABO-HDN 的 209 例新生儿均为上

述 1388 例中的孕妇所分娩。对此 209 例新生儿出生后监测其血清胆红素并及时做 HDN 三项试验, 本研究结果表明, 209 例全部放散试验阳性, 放散合并游离试验阳性的 113 例, 放散合并直抗+游离试验阳性的为 63 例, 可见免疫试验结果支持了临床诊断, 放散试验可作为确诊 ABO-HDN 的重要依据, 以便对 ABO-HDN 及早发现和治疗, 保护新生儿健康。

研究表明, ABO-HDN 发病风险与母血清 IgG 抗 A(B)效价有一定相关性, 随其水平的升高而递增<sup>[11-12]</sup>。一般认为, 以试管法检测孕妇 IgG 抗 A(B)效价达到 64 时<sup>[2-3]</sup>, 则有发病的可能, 如果其水平持续性升高, 应及时采取临床干预措施。以往常用于产前孕妇 IgG 血型抗体效价检测的方法主要是试管抗人球蛋白试验, 用该法测得孕妇 IgG 抗体效价为 64 时, 即是预防 ABO-HDN 有临床意义的参考值。微柱凝胶法以其较高的灵敏度、更简便的操作, 目前已逐步取代传统的试管法应用于 ABO-HDN 的产前检测<sup>[6,11]</sup>, 鉴于微柱凝胶技术用于产前 IgG 抗体效价检测比试管法具有更高的灵敏度, 研究认为各实验室应在试验基础上确立微柱凝胶技术相应的参考值<sup>[2,7,13]</sup>, 以避免灵敏度过高对正确分析病情造成干扰。对微柱凝胶技术参考值的确定, 已有的研究报道观点不尽相同, 有学者认为与传统试管抗人球蛋白法差别不大, 即以效价 64 为参考值<sup>[14-15]</sup>; 另有学者则认为应将效价设在 128 左右<sup>[13,16]</sup>; 还有学者认为应设在 256 附近<sup>[17-18]</sup>。本研究显示, 产后检测确诊的 209 例 ABO-HDN 患儿母体血清 IgG 抗体效价, 除 3 例合并有 G-6-PD 酶缺乏新生儿的母体抗体效价为 128 外, 其余的 206 例抗体效价均  $\geq 256$ , 考虑 G-6-PD 缺乏是由于红细胞不能激活戊糖磷酸的代谢途径, 并降低抗氧化能力, 从而伴发高胆红素血症。综合上述结果, 笔者提出应用国产微柱凝胶技术产前检测 ABO-HDN 母体 IgG 抗体效价以 256 作为参考值是恰当的, 而正常参考范围为  $<256$  较为合理。当然, 各实验室在将不同的微柱凝胶卡用于母体抗体效价检测时, 不同的操作程序及人员, 也会导致其参考值出现差异。因此, 有必要根据试验建立各实验室的临床参考值, 根据各自科室的情况设立标准, 并把相关信息通知产科或新生儿科医生。

当前, 临床实验室常用于检测母体 IgG 类抗体的方法是传统的试管法抗人球蛋白试验<sup>[6]</sup>。1945 年, 科学家 Coombs 发明制备了抗 IgG 类抗体的抗人免疫球蛋白抗体, 以此搭桥使盐水介质中的相应 IgG 抗体和红细胞发生肉眼可见的凝集反应。该技术也被称之为 Coombs 实验, 由此发现了很多新生儿溶血性疾病和输血反应是 IgG 类抗体所致, 而应用传统的盐水血凝试验无法检测。半个多世纪以来, Coombs 试验始终是最

经典、最准确检测不完全抗体(主要是 IgG 类)的方法。但由于传统试管法 Coombs 试验方法复杂,孵育时间长等原因,不适用于大批量样本的检测。1990年, Lapierre 等<sup>[10]</sup>报道了检测红细胞抗原抗体反应的一种新方法—微柱凝胶试验。至今,在一些国家该方法已成为输血相容性及 HDN 相关抗体检测的一种常规方法<sup>[20-21]</sup>。微柱凝胶免疫检测新技术是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。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。微柱凝胶 Coombs 试验孵育后的红细胞不需三洗,且该法孵育时间只需 15 min,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,使其能更广泛地应用在 HDN 相关的母体 IgG 类抗体检测中<sup>[13]</sup>。本研究显示,确诊的 209 例 ABO-HDN 中,206 例其患儿母血清 IgG 抗体效价均达到或超过 256,也说明了应用微柱凝胶技术进行产前效价的检测能对 HDN 的发生发展趋势做出一定的预判,微柱凝胶法检测孕妇 IgG 血型抗体效价可作为评估 HDN 发生风险的指标之一<sup>[22]</sup>。

同时,本文检测结果表明,IgG 抗体效价  $\geq 256$ (异常例数)的有 1388 例,但确诊的仅 206 例,约 85% 的新生儿并未发病。由此也表明,IgG 血型抗体效价并非判断 HDN 严重程度的唯一性指标,HDN 的严重程度可能与很多因素有关,如母体抗体的 IgG 亚型和糖基化、血型抗原的结构、位点密度、发育成熟程度及在其他组织中的分布、IgG 抗体经胎盘转运的速率、胎儿脾脏功能成熟度、Fc 受体功能多态性的影响、人类白细胞抗原相关抑制抗体的影响等<sup>[7]</sup>。因此有研究认为,对于产前检测效价持续升高者,还应结合其他检测项目,如羊水、B 超检查等及孕妇临床状况综合分析,做出判断<sup>[12]</sup>。

#### [参考文献]

[1] Kaushansky K, Lichtman MA, Beutler E, et al. Williams Hematology [M]. 8th edition, New York: McGraw-Hill Book Company, 2010: 985.

[2] 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.

[3] 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: 266-270.

[4] 中华医学会儿科学会新生儿学组. 新生儿黄疸干预推荐方案[J]. 中华儿科杂志, 2001, 16(8): 501-502.

[5] 金汉珍, 黄德珉, 宫希吉. 实用新生儿学下册[M]. 3 版, 北京: 人民卫生出版社, 2002: 28-33.

[6] 中国医师协会输血科医师分会. 新生儿溶血病(HDN)免疫血液学试验推荐方案[J]. 中国输血杂志, 2012, 25(2): 95-96.

[7] 王宇宏, 李凌波. 两种微柱凝胶抗人球蛋白试验检测孕妇 IgG 血型抗体效价的比较研究[J]. 中国妇幼保健, 2014, 29(20): 3241-3245.

[8] 刘达庄. 免疫血液学[M]. 上海: 上海科学技术文献出版社, 2002: 135-136.

[9] Subspecialty Group of Neonatology, Society of Pediatrics, Chinese Medical Association, Chinese Multicenter Study Coordination Group for Neonatal Bilirubin Encephalopathy. Clinical characteristics of bilirubin encephalopathy in Chinese newborn infants—a national multicenter survey [J]. Zhonghua Er Ke Za Zhi, 2012, 50(5): 331-333.

[10] 姚文娟, 杨均, 刘寓. O 型孕妇血 IgG 抗体效价与新生儿溶血病发病的研究分析[J]. 现代中西医结合杂志, 2013, 22(8): 876.

[11] Chen JY, Ling UP. Prediction of the development of neonatal hyperbilirubinemia in ABO incompatibility [J]. Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei), 1994, 53(1): 13-18.

[12] 朱业华, 伍伟健, 马春会, 等. 国内 10 省市孕妇孕期 IgG 血型抗体效价与 ABO 新生儿溶血病的相关性分析[J]. 中国生物制品学杂志, 2012, 25(4): 477-479.

[13] 李凌波, 王冬倩, 陈云声, 等. 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[J]. 中国免疫学杂志, 2008, 24(12): 1138-1141.

[14] 何烁晴, 韩君儒. 微柱凝胶法在孕妇 IgG 抗体效价检测中的临床应用[J]. 中外医学研究, 2010, 8(22): 73.

[15] 雷厉, 曾劲峰. 微柱凝胶技术检测孕妇血型抗体效价的研究[J]. 中国热带医学, 2005, 5(6): 1175-1176.

[16] 高小华, 胡永红, 陈小洁. 两种方法检测孕妇产前血清中 ABO 血型 IgG 抗体效价的结果分析[J]. 广州医药, 2010, 41(6): 48-49.

[17] 李明, 武建新. 微柱凝胶法检测孕妇 IgG 抗-A(B)抗体效价结果的判定[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(11): 1347-1348.

[18] 谢一唯. 孕妇血清 IgG 抗-A(B)抗体效价微柱凝胶法室内参考值测定[J]. 全科医学临床与教育, 2009, 7(5): 476-477.

[19] Lapierre Y, Rigal D, Adam J, et al. The gel test: a new way to detected cell antigen-antibody reaction [J]. Transfusion, 1990, 30(2): 109-113.

[20] Lamba DS, Mittal K, Sood T, et al. Antibody screening in multitransfused patients: a prerequisite before each transfusion [J]. Transfus Apher Sci, 2014, 51(2): 132-133.

[21] Hassan MN, Mohd-Noor NH, Johan-Noor SR, et al. Hemolytic disease of fetus and newborn due to maternal red blood cell alloantibodies in the Malay population [J]. Asian J Transfus Sci, 2014, 8(2): 113-117.

[22] 马晓露. 孕母血型抗体与新生儿 ABO 溶血病发生的相关性分析[J]. 中国试验诊断学, 2009, 13(12): 1744-1746.

(收稿日期: 2015-01-26 本文编辑: 任念)