

用微柱凝胶法诊断新生儿溶血病的实验研究

王宇宏¹, 刘冰²

(1. 吉林省妇幼保健院 检验科, 吉林 长春 130051; 2. 吉林大学第一医院 输血科, 吉林 长春 130021)

新生儿溶血病 (Hemolytic disease of newborn, 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, 常可导致新生儿黄疸、贫血、水肿等, 严重者将造成新生儿生理缺陷甚至死亡^[1]。HDN 主要包括 ABO 血型及 Rh 血型等溶血病, 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^[2,3], 我国有研究表明 ABO-HDN 占新生儿溶血病的 85. 8%^[3]。HDN 血清学检测的“3 项试验”: 直接抗人球蛋白试验、游离抗体试验和抗体释放试验对该病的诊断最具有价值, 目前临床常用传统的试管抗人球蛋白试验 (Coombs 试验) 进行检测, 操作步骤多、时间长、结果不便于保存, 作者对近年我院送检的 79 例 ABO-HDN 患儿血液标本以国产微柱凝胶试剂卡进行 3 项试验的检测, 现将统计分析后的结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 临床标本 我院送检的疑似 ABO-HDN 的新生儿外周血标本 79 例, 患儿以黄疸或进行性黄疸加重为主要症状, 年龄为出生 24 h 内至 7 天, 其中 61 例为出生小于或等于 5 天的新生儿的标本, 18 例为出生超过 5 天的标本。79 例标本中男性 42 例、女性 37 例, 患儿均为 A 型或 B 型, 与其母均为 ABO 血型不合, 母均为 O 型 RhD 阳性。

1.2 试剂仪器 微柱凝胶法新生儿溶血病检测卡 I (ABO、RhD 血型复查, 直接抗人球蛋白试验)、微柱凝胶法新生儿溶血病检测卡 II (游离抗体试验、抗体释放试验)、ABO 标准红细胞 (0. 8%), 以上均由长春博讯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。

1.3 检测方法

1.3.1 血型复查及直接抗人球蛋白试验 取新生儿溶血病检测卡 I (1- 6 管) 加患儿 0. 8% 红细胞悬液 50 μl, 专用离心机离心 5 min (900 rpm, 2 min, 1 500 rpm, 3 min), 离心后观察结果, 以凝集红细胞停留在胶表面或胶中为阳性。

1.3.2 游离抗体试验及抗体释放试验 取新生儿溶血病检测卡 II, 将 1- 3 管分别标记为 A 细胞、B 细胞、O 细胞, 将 4- 6 管分别标记为 A 细胞、B 细胞、O 细胞。游离抗体试验将患儿血清 50 μl 分别加入前 3 管; 抗体释放试验将患儿放散液 50 μl 分别加入后 3 管, 患儿红细胞放散液按文献^[4]制备。按标记分别将 0. 8% A 细胞、B 细胞、O 细胞悬液各 50 μl 加入 1- 6 管, 置专用孵育器内 37 °C 孵育 15 min, 再放入专用离心机内离心 5 min (900 rpm, 2 min, 1 500 r/min, 3 min), 离心后观察, 阳性结果判断标准同上。

1.3.3 通过新生儿溶血病 3 项试验判断 ABO-HDN 的方法^[5] 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。

1.3.4 统计学处理 阳性率差异分析采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 79 例疑似 ABO-HDN 样本 3 项试验结果 3 项试验检测阳性结果见表 1。3 项试验不同阳性的分布及结果判断见表 2, 由表 2 结果中可见 ABO-HDN 确诊数为 70 例, 阳性率 88. 61%, 且确诊病例抗体释放试验均为阳性。

表 1 79 例样本 3 项试验检测阳性结果

检测例数	直抗试验		游离试验		释放试验	
	阳性数	阳性率 (%)	阳性数	阳性率 (%)	阳性数	阳性率 (%)
79	28	35.44	62	78.48	70	88.61

表2 79例样本3项试验不同阳性的分布及结果判断

直抗试验	游离试验	释放试验	n(%)	ABO-HDN
+	+	+	23(29.11)	确诊
-	+	+	39(49.37)	确诊
+	-	+	5(6.33)	确诊
-	-	+	3(3.80)	确诊
+	+	-	0(0)	确诊
-	+	-	0(0)	可疑
+	-	-	0(0)	可疑
-	-	-	9(11.39)	否定

注: + 表示阳性, - 表示阴性; 游离及放散试验均未检出与标准O细胞反应抗体

表3 确诊样本中ABO血型分布及检出抗体特异性

ABO 血型		n(%)	直抗阳性数	游离抗体				释放抗体			
母	婴			抗- A	抗- B	抗- A, B	合计	抗- A	抗- B	抗- A, B	合计
O	A	33(47.14)	16	27		1	28	30		3	33
O	B	37(52.86)	12		31	3	34		34	3	37
合计		70(100)	28	27	31	4	62	30	34	6	70

表4 ABO-HDN 阳性率与新生儿出生天数的关系

出生天数	ABO-HDN 阳性	ABO-HDN 阴性	阳性率(%)
≤5	58	3	95.08
>5	12	6	66.67

3 讨论

我国汉族HDN绝大多数由ABO血型系统抗体引起,其中最多见的是母亲为O型,胎儿为A型或B型。理论上母亲A型,胎儿B型或AB型或母亲B型,胎儿A型或AB型时也可以发病,但实际病例很少。关于A/B血型的发病率各地报道不一,与地区血型基因频率分布不同有关,也可由A/B抗原性强弱不同所致^[6,7]。本研究结果显示,在确诊的70例ABO-HDN中,B型占52.86%,A型占47.14%,两者差异无统计学意义($P > 0.05$),与文献^[8]报道相符。B型分布略高于A型,与本地区(吉林省)ABO血型分布(A型25.18%,B型33.18%)规律相一致^[9]。

新生儿ABO-HDN的确诊依赖于血清学3项检查^[10]。直抗试验是检查患儿红细胞是否致敏了不完全抗体,但在ABO-HDN此项试验常反应微弱甚至无法检出^[3],本研究结果直抗试验阳性率仅为35.44%,在3项试验中阳性率最低。考虑与ABO血型抗原在新生儿红细胞膜上发育不完全,红细胞上A、B抗原相对较少有关。游离抗体试验是检测患儿血清中的游离抗体,该试验阳性提示继续溶血的可能,本检测结果该试验阳性率为78.48%,但因游离抗体只在出生后头几天存在,以后迅速消失,因此对晚

2.2 确诊样本中ABO血型分布及检出抗体特异性

结果见表3。确诊ABO-HDN 70例,其中母-婴血型O-A者为33例,占47.14%,O-B者为37例,占52.86%,两组比较差异无统计学意义($\chi^2 = 0.46, P > 0.05$)。

2.3 ABO-HDN 阳性率与新生儿出生天数的关系

结果见表4。出生天数小于或等于5天新生儿共61例,ABO-HDN的阳性率为95.08%,明显高于出生天数大于5天者(共18例)的66.67%,具有统计学意义($\chi^2 = 8.48, P < 0.01$)。

期诊断意义不大,且如仅游离抗体阳性只表明患儿体内有抗体而不一定致敏,不能据此确诊^[3]。而抗体释放试验是从患儿红细胞上释放出抗体,与成人相同血型的红细胞反应,阳性则提示存在溶血,本研究显示该试验阳性率达到88.61%,远高于其他2项检查。另外,本研究中79例样本3项试验不同阳性的分布及结果判断显示,3项试验均阳性的为23例(占29.11%),游离试验阴性同时直抗试验与释放试验阳性的5例(占6.33%),单项释放试验阳性的3例(占3.80%),值得注意的是ABO-HDN患儿的红细胞上虽然结合了其母不完全抗体,但直抗试验阴性,这并不表示其红细胞上没有结合抗体,可能只是抗体较少不足以和抗人球蛋白产生可见的反应,将其放散液做间接抗人球蛋白试验(即释放试验)则可表现为阳性结果,此种情况即直抗试验阴性同时游离试验与释放试验阳性的比例最多为39例(占49.37%)。在根据3项试验结果确诊ABO-HDN的判断方法中,仅一种阳性分布没有出现,即释放试验阴性同时直抗与游离试验阳性,考虑到诊断ABO-HDN的最有力证据是证实患儿红细胞被来自母亲的IgG抗A(B)所致敏^[4],此种情况下患儿红细胞已致敏了不完全抗体,且血清中亦存在游离的抗体,理论上释放试验应该是阳性,故可以确诊,有研究认为^[11]此种结果与制备放散液没有控制好时间和温度有关,导致释放试验假阴性。本研究结果显示,79例疑似ABO-HDN样本中,确诊的70例样本抗体释放试验均为阳性,以上都说明在ABO-HDN的溶血3项试验

中,以抗体释放试验最为重要、敏感度最高,是诊断 ABO-HDN 最有力的证据^[12]。

报告显示^[4],在 ABO-HDN 的检测中,溶血 3 项试验阳性率与采血时机有很大关系,患儿的血清学检查最好在出生后 3-7 天进行,以防止致敏的红细胞大部分被破坏,从而使真正的 ABO-HDN 漏检。可见,ABO-HDN 的检出率与新生儿出生时间有关,其筛查试验就是要快速检测出新生儿红细胞上的 IgG 类抗体,为避免可能出现的“高胆红素血症”及其他危及新生儿的严重后遗症,故临床上对 ABO-HDN 患儿应做到尽量早发现早作检测以确诊。本研究结果表明,出生天数小于或等于 5 天新生儿 ABO-HDN 的阳性率为 95.08%,明显高于出生天数大于 5 天新生儿的 66.67%,两者差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。因此,母婴 ABO 血型不合并发生新生儿黄疸的疑似 ABO-HDN 患儿,应尽早送检且最好采用出生 5 天内的标本,可提高阳性指标的检出率,以明确诊断从而避免延误治疗。

在 ABO-HDN 血清学检查中,除血型鉴定外,其他均是以抗人球蛋白试验(Coombs 试验)为技术手段的 IgG 类抗体检测。传统的试管法 Coombs 试验检测 IgG 类抗体及直抗试验步骤多、操作繁琐费时,且受时间、凝集强度等因素的影响,结果判定有一定难度。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,国内有研究表明^[13],采用国产微柱凝胶免疫检测试剂卡进行 ABO-HDN 血清学系列试验,结果可靠与临床诊断符合率达 98%,ABO-HDN 阳性检出率显著高于同时平行采用的试管法,认为该国产微柱凝胶方法为新生儿溶血病实验室诊断提供了

可靠依据。结合本实验研究结果,通过应用国产微柱凝胶试剂卡进行 ABO-HDN 3 项试验的检测,显示该方法能快速准确检测出 ABO-HDN,且操作简便,结果可保存,值得临床推广。

参考文献:

[1] 李 勇, 马学严主编. 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. 410- 411.

[2] 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.

[3] 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.

[4] 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. 267- 268.

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

[6] Narang A, Jain N. Hemolytic disease of newborn[J]. Indian J Pediatr, 2001, 68(2): 167.

[7] 皇甫琴. 新生儿 ABO 溶血 75 例临床分析[J]. 新生儿科杂志, 2004, 19(4): 170.

[8] 马晓红, 韩 林, 毛潇君. 新生儿 ABO 溶血病 10 年病例回顾分析[J]. 中国优生与遗传杂志, 2001, 9(6): 76.

[9] 彭德仁. 中国汉族人 ABO 血型的分布[J]. 中国输血杂志, 1991, 4(1): 21.

[10] Ciancianullo M A, Ceccon M E, Vaz F A. Prevalence of immunohematologic tests at birth and the incidence of hemolytic disease in the newborn [J]. Rev Assoc Med Bras, 2003, 49(1): 45.

[11] 郑艳玲, 周小在. 微柱凝胶法在新生儿溶血病检测中的应用[J]. 检验医学与临床, 2008, 5(17): 1027.

[12] Bruni M C, Stubbs J R. 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.

[13] 刘 冰, 赵 震, 林宏杰, 等. 微柱凝胶免疫检测法在新生儿溶血病临床诊断上的应用[J]. 中国实验诊断学, 2006, 10(5): 544.

(收稿日期: 2010- 11- 26)