

自制 Coombs 微柱凝胶卡的临床应用研究*

梁华钦, 罗广平[#], 张润青, 骆宏[△], 姬艳丽, 赵阳, 魏玲, 莫春妍, 王贞

(广州血液中心临床输血研究所 510095)

【摘要】 目的 探讨自制 Sephadex-G50 Coombs 微柱凝胶卡应用于稀有血型抗体筛选和新生儿溶血病检测的可行性。**方法** 以 Sephadex-G50 凝胶为载体, 制备 Sephadex-G50 Coombs 微柱凝胶卡。取无偿献血者血清与稀有血型(Mur)抗原阳性红细胞加入凝胶卡反应腔, 37℃ 孵育后 15 min 离心, 观察结果。再取阳性反应者血清, 用 2-Me 灭活 IgM 型抗体后, 重复前述步骤, 以确定是否含 IgG 型抗-Mur。取新生儿血液标本, 进行直抗实验、游离抗体实验和放散液抗体检测实验。**结果** 2 600 名无偿献血者中, 检出 1 例 IgM 型抗-Mur。246 例新生儿溶血病标本中, 检出 ABO 溶血病 210 例, RhD 溶血病 5 例, RhE 溶血病 2 例, 抗-M 和抗-Jk^a 引发的溶血病各 1 例。自制凝胶卡与进口凝胶卡检测结果一致。**结论** 自制 Sephadex-G50 Coombs 微柱凝胶卡与进口凝胶卡检测结果差异无统计学意义, 且具有成本低、工艺简单的特点, 可用于血型血清学临床实验。

【关键词】 微柱凝胶; 稀有血型抗体; 新生儿溶血病

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2012.15.003 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2012)15-1830-02

The clinical application study of homemade coombs gel card* LIANG Hua-qin, LUO Guang-ping[#], ZHANG Run-qing, LUO Hong[△], JI Yan-li, ZHAO Yang, WEI Ling, MO Chun-yan, WANG Zhen (Institute of Clinical Transfusion Medicine, Guangzhou Blood Center, Guangzhou 510095, China)

【Abstract】 Objective To study the clinical application of homemade gel coombs card in screening rare antibody and determining hemolytic disease of the newborn. **Methods** Sephadex-G50 gel particle was used as carrier in homemade gel card. Donor's serum and red blood cell suspension with Mur antigen positive were added to the reaction chamber of the card, then it was centrifuged after it had been incubated at 37℃ for 15 minutes. The positive reaction serum was used to repeat the same test with the gel card after it had been dealt with 2-Me to inactivate the IgM antibodies so as to ascertain whether it had IgG anti-Mur. The newborn's blood specimens were used to do direct anti-globulin test, free antibody determination and eluate test. All the tests were done with both homemade coombs card and DG GEL Coombs card. **Results** IgM anti-Mur antibody was found in one of 2 600 donors. 246 cases were diagnosed HDN, including 210 ABO-HDN cases, 5 RhD-HDN cases, 2 RhE-HDN cases and 2 cases caused by anti-M and anti-JK^a. **Conclusion** There is no difference between the homemade card and DG GEL card in this study. Lower cost and simple process will give the homemade card more application in routine work.

【Key words】 microcolumn gel, anti-Mur, hemolytic disease of the newborn

自 1986 年法国的 Lapierre 等^[1]发明微柱凝胶卡以来, 其简便、快捷、重复性好、敏感度高、易于标准化和自动化等优点使得其在血型血清学领域得到了广泛的应用。目前, 在中国使用较多的是国外公司的产品。由于成本因素, 导致很多医疗机构无法使用, 因此, 开发国产凝胶卡具有重要的现实意义。经过前期筛选, 研制了以 Sephadex-G50 凝胶颗粒为载体的微柱凝胶卡, 并在稀有血型抗体(抗-Mur)的大规模筛查实验和新生儿溶血病检测实验中进行了应用, 现报道如下。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂和设备 自制 Sephadex-G50 Coombs 微柱凝胶卡, DG Gel Coombs 凝胶卡(西班牙 Grifols 公司), Mur 抗原阳性细胞(本实验室保存的稀有细胞), 人源抗-Mur 血清(本实验室保存的一位长期输血产生抗-Mur 的 AB 型患者的血清, 已用上海血液生物医药有限公司生产的谱细胞鉴定), 谱细胞(美国 IMMUCOR 公司), 戴安娜专用孵育器, 戴安娜专用离心机, KA220 血清学专用离心机(日本久保田公司)。

1.2 Sephadex-G50 Coombs 微柱凝胶卡的制备

1.2.1 空白塑料卡的设计 空白微柱凝胶卡由硬质塑料构成, 大小为 74 mm×52 mm, 含 6 个反应柱, 反应柱由分离柱和反应腔组成。

1.2.2 制备抗人球蛋白混悬液 在抗人球蛋白血清中分别加入乙二胺四乙酸二钠(EDTA-Na₂)后, 加入适量高分子聚合物材料, 调整混合液 pH 至 6.3, 最后加入适量叠氮钠。

1.2.3 凝胶灌注 称取 Sephadex-G50 凝胶颗粒 4 g, 加入 72 mL 上述抗人球蛋白血清中, 充分混匀后, 用微量加样枪将此凝胶混悬液加入微柱凝胶反应卡的管中, 每管 28 μL, 贴好标签备用。

1.3 实验标本 2011 年 5 月至 2012 年 1 月, 广州市内医院送检的新生儿溶血病标本 246 例, 本中心无偿献血者标本 2 600 例。其中, 新生儿标本均为未抗凝血, 献血者标本均为 EDTA 抗凝血。

1.4 抗-Mur 筛查 用微柱凝胶卡方法筛查 2 600 名无偿献血者血清中 37℃ 有活性的抗-Mur。将 1% Mur 抗原阳性红细胞悬液 50 μL 及无偿献血者血浆 25 μL 加入自制 Sephadex-

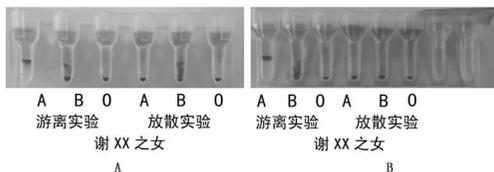
G50 Coombs 凝胶卡反应槽中,于 37 °C 孵育 15 min,离心观察结果。若出现凝集反应,则用谱细胞鉴定抗体的特异性,如果该抗体与 Mur 抗原阳性的细胞凝集,与 Mur 抗原阴性的细胞均不凝集,则抗体特异性鉴定为抗-Mur。用 2-Me 处理血清后,重复上述操作,在自制 Sephadex-G50 Coombs 凝胶卡中仍能与 Mur 抗原阳性细胞反应则为 IgG 型抗-Mur,不能反应则为 IgM 型抗-Mur。同时,用 DG Gel Coombs 凝胶卡做平行对照实验。

1.5 新生儿溶血病检测 取自制 Sephadex-g50 Coombs 卡和 DG Gel Coombs 卡,进行新生儿溶血病的直抗实验、游离抗体检测实验和放散液抗体检测实验。所有操作均严格按照凝胶卡试剂说明书进行。

2 结果

2.1 抗-Mur 筛查结果 2 600 名无偿献血者中有 1 名献血者血清与 Mur 抗原阳性细胞有凝集反应,强度为 4+,经谱细胞鉴定为抗-Mur。用 2-Me 处理该血清后,与 Mur 抗原阳性细胞无凝集反应,证明该抗体为 IgM 型。自制 Sephadex-G50 Coombs 卡与 DG Gel Coombs 卡检测结果一致。

2.2 新生儿溶血病检测 246 例新生儿溶血病标本中,检出 ABO 溶血病 210 例,RhD 溶血病 5 例,RhE 溶血病 2 例,抗-M 1 例,抗-Jk^a 1 例,其余 27 例不能证实为母婴血型不合新生儿溶血病。其中,ABO 溶血病标本中,检出直抗实验阳性者 125 例(≤1+),不规则抗体引起的溶血病标本,直抗实验均阳性(其中 4+3 例,≤3+6 例)。172 例标本游离抗体检测阳性,219 例标本的放散液抗体检测实验阳性。新生儿溶血病 3 项实验检出率分别为:直抗阳性率 61.2%(134/219),游离抗体检测阳性率 78.5%(172/219),放散液抗体检测实验阳性率为 100.0%(219/219)。所有结果与对照的 DG Gel Coombs 凝胶卡一致,见图 1。



注:A 为自制 Sephadex-G50 Coombs 卡检测结果;B 为 DG GEL Coombs 卡检测结果。

图 1 新生儿溶血病游离抗体实验和放散液抗体检验实验结果

3 讨论

微柱凝胶试验是红细胞膜抗原与相应抗体在凝胶介质发生的免疫反应,该方法在微柱中加入硫酸葡聚糖凝胶,利用凝胶的分子筛效应,通过调节凝胶的孔径,只允许游离的红细胞通过,多个红细胞的凝块不能通过,在离心力的作用下通过空间位阻作用将游离的红细胞和凝集的红细胞区分开^[2]。由于该方法简单、快捷,结果清晰、直观,易于标准化,因此在血清学领域得到了广泛应用,尤其是在交叉配血和血型鉴定方面。但在大规模的不规则抗体筛查和新生儿溶血病检测方面的应用报道相对较少。

Mur 抗原在亚洲人群尤其是中国南方人群的分频率较高,具有重要的临床意义。抗-Mur 可导致严重的新生儿溶血病及溶血性输血反应,因此,了解抗-Mur 的分频率对于指导临床输血及产前抗体监测显得尤为重要。既往已有的研究表明,中国抗-Mur 频率介于 0.07%~0.21%^[3-5]。但这些研究

中,筛查抗体的方法大部分都是用盐水微板法,检出的抗体仅限于 IgM 型抗体,然而大多数 IgM 型抗体在 37 °C 都是没有活性的,因此没有临床意义,而具有临床意义的 IgG 型抗体往往被这些检测方法漏检。本研究采用自制微柱凝胶卡和进口微柱凝胶卡同步对比实验的方法,经 37 °C 孵育后对抗-Mur 进行筛查,旨在检出在 37 °C 有活性的抗体,此方法能检出 IgG 型及 37 °C 有活性的 IgM 型抗体。本研究对献血者抗-Mur 调查结果显示,37 °C 有活性的抗-Mur 频率为 0.04%,低于上述报道的频率,可能是因为本次实验所采用的检测方法在上述微板法不同,有些 IgM 型抗体经过 37 °C 孵育后失去活性。这些 37 °C 环境下无活性的抗体不具有临床意义。

新生儿溶血病的确诊依赖于血清学 3 项实验。直抗实验阳性在新生儿溶血病诊断中有着非常重要的作用,阳性结果提示患儿体内红细胞被抗体致敏,阳性强度提示发生溶血的相关程度^[6-7]。因此,新生儿溶血病实验诊断中对凝胶卡的灵敏度要求较高,本研究中确诊为新生儿溶血病的标本用自制抗人球蛋白凝胶卡检测,其直抗实验阳性率为 61.2%,与同类进口凝胶卡没有差异。因游离抗体存在时间短,一般在出生后几天迅速减弱直至消失,因此,早期的新生儿标本游离抗体检出的阳性率高于晚期标本,本研究中的游离抗体检出率为 78.5%。放散液抗体检测实验是检测从患儿红细胞上放散的抗体,阳性则提示患儿红细胞结合了来自母亲的 IgG 抗体,是诊断新生儿溶血病的直接证据。其阳性率远高于其他 2 项检查,本研究确诊的 219 例新生儿溶血病标本,其阳性率为 100.0%。新生儿溶血病主要是 IgG 类抗体检测,传统的试管法检测步骤多、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。本研究结果表明,通过应用国产微柱凝胶卡进行新生儿溶血病 3 项实验的检测,显示该方法能快速准确测出结果,且操作简便,结果可保存,与进口同类凝胶卡检测结果相比差异无统计学意义,值得临床推广。

参考文献

[1] Lapierre Y, Rigal D, Adam J, et al. The gel test: a new way to detect red cell antigen-antibody reactions [J]. Transfusion, 1990, 30: 109-113.
 [2] 马曙轩,刘景汉,李锡金. 应用微柱凝胶法鉴定 ABO 及 RH(D)血型[J]. 中国生物制品学杂志, 2002, 15(1): 53-54.
 [3] 向东,朱自严,刘达庄,等. 上海市无偿献血者 Miltenberger 抗体频率的调查[J]. 中国输血杂志, 2000, 13(4): 267-268.
 [4] 孙爱农,黄丽雅,许惠根,等. 自动化微量板法检测红细胞不规则抗体的研究[J]. 现代检验医学杂志, 2007, 22(6): 9-12.
 [5] 邓诗桢,严康峰,谢敬文. 番禺地区 Mur 抗原与抗-Mur 频率调查[J]. 中国输血杂志, 2010, 23(3): 218.
 [6] 金汉珍,樊绍曾. 新生儿母婴血型不合溶血病[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1981: 115.
 [7] 刘达庄. 免疫血液学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2002: 130.